



Inês Alexandra Costa Duarte

Licenciada em Bioquímica

**Avaliação do potencial bioativo de produtos
de alfarrobeira, *Ceratonia siliqua* L.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, FCT-UNL

Co-Orientadora: Doutora Elisabete Muchagato Maurício,
Professora Auxiliar, ULHT.

Júri

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Arguente: Prof. Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves

Vogal: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2018



Inês Alexandra Costa Duarte

Licenciada em Bioquímica

**Avaliação do potencial bioativo de produtos
de alfarrobeira, *Ceratonia siliqua* L.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, FCT-UNL

Co-Orientadora: Doutora Elisabete Muchagato Maurício,
Professora Auxiliar, ULHT.

Júri

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Arguente: Prof. Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves

Vogal: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2018

**Avaliação do potencial bioativo de produtos de alfarrobeira, *Ceratonia siliqua* L. Copyright ©
Inês Alexandra Costa Duarte, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de
Lisboa, Universidade Nova de Lisboa.**

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Todo este percurso foi possível graças ao apoio de diversas pessoas a quem eu manifesto todos os meus agradecimentos.

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais que me apoiaram desde o início e me proporcionaram a oportunidade de tirar um curso superior, transmitindo compreensão, confiança e força, mesmo nas alturas mais complicadas. Também a toda a minha família que sempre se mostrou preocupada e confiante nesta fase da minha vida.

À professora Doutora Maria Paula Duarte, pela orientação prestada, pelo apoio e disponibilidade demonstrada ao longo de todo o trabalho, bem como pela compreensão e ajuda que sempre ofereceu. Gostei muito de trabalhar consigo.

À professora Doutora Elisabete Muchagato Maurício, pelo auxílio que também me ofereceu.

Aos colegas de laboratório, pela ajuda e compreensão que me transmitiram.

A todos os restantes professores e colegas que de igual forma me ajudaram a concluir esta etapa.

A todos os meus amigos, que de alguma forma me deram força e demonstraram preocupação, pelas conversas de apoio, e pela companhia.

Um agradecimento especial à Jessica e à Filipa que estiveram sempre presentes, se preocuparam e me ajudaram com as suas palavras amigas e com os momentos de descontração e risos que me alegraram até nos momentos mais complicados. Obrigada pela vossa amizade.

Resumo

Atualmente, o fruto originário da *Ceratonia siliqua* L., a alfarroba, tem despertado o interesse de vários setores industriais, devido às características benéficas que lhe estão associadas. O presente estudo recaiu sobre a avaliação do potencial bioativo dos diferentes componentes da alfarroba, largamente cultivada em Portugal e em outros países mediterrâneos. O seu objetivo foi adquirir um conhecimento mais aprofundado sobre as suas propriedades, preparando extratos etanólicos de polpa, grão e vagem inteira (misto), e um extrato aquoso da polpa, determinando o seu teor em compostos fenólicos totais e flavonoides totais, e procedendo à avaliação da sua atividade antioxidante e antimicrobiana, bem como à avaliação da sua possível mutagenicidade.

A atividade antioxidante dos vários componentes da alfarroba foi determinada com recurso a diversos tipos de ensaios. Mais concretamente, a avaliação da sua capacidade de redução, através dos ensaios FRAP e CUPRAC, a avaliação da capacidade de sequestro do radical DPPH[•] e a avaliação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido. A atividade antimicrobiana foi determinada através de dois métodos distintos, o método por difusão em agar e o método da microdiluição, utilizando onze microrganismos diferentes: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Propionibacterium acnes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A atividade mutagénica foi pesquisada através do Teste de Ames, utilizando duas estirpes distintas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium: TA100 e TA102.

Os resultados obtidos demonstraram que os extratos preparados a partir de todos os diferentes componentes da alfarroba possuem atividade antioxidante, sendo que o extrato etanólico de grão foi o que apresentou um teor mais elevado em compostos fenólicos e flavonoides, tendo apresentado uma atividade antioxidante e antimicrobiana, muito superior aos restantes extratos analisados. Os extratos que apresentaram resultados mais fracos relativamente às propriedades estudadas foram os extratos etanólicos de polpa e misto (extrato contendo polpa e grão em proporções adequadas).

Palavras-chave: Alfarroba, compostos fenólicos, flavonoides, teste de Ames, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

Abstract

Currently, the fruit originary from *Ceratonia Siliqua* L., the carob, is the object of interest of several industrial sectors, due to its beneficial characteristics associated with this fruit.

The present study was focused on the bioactive potential of the carob's different components, a plant that is widely cultivated in Portugal and other Mediterranean countries. Its main target was to acquire a more in-depth knowledge of its properties, preparing ethanolic extracts of the pulp, seed and the pod (mixed extract, containing pulp and seed), and also an aqueous extract of the pulp, and by determining its content in phenolic compounds, by the Folin-Ciocalteu method, its content in flavonoids, and by evaluation of its antioxidant and antimicrobial activity, as well as the evaluation of its mutagenicity.

The extract's antioxidant activity was determined by different assays. More specifically, the assessment of its reducing capacity with the FRAP and CUPRAC assays, and of its scavenging of DPPH[•] and superoxide anion radical. The antimicrobial activity was determined by two different methods, the agar diffusion method and microdilution method, using eleven different microorganisms: *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Propionibacterium acnes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The mutagenic properties were measured by an Ames test, using two distinct strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: TA100 e TA102.

The results showed that the extracts of all the different carob's components have antioxidant activity. The seed's ethanolic extract presented a higher content in phenolic compounds and flavonoids, as well as it was the one that exhibited a higher antioxidant and antimicrobial activity, much superior to the other extracts analyzed. The extract that showed weaker results with respect to the studied properties were the ethanolic extracts of pulp and mixed.

Key words: Carob, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity, Ames assay, antimicrobial activity.

SIMBOLOGIA E NOTAÇÕES

CUPRAC – *Cupric Reducing antioxidant capacity*

DPPH – 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo

EAA – Equivalente de ácido ascórbico

EAG – Equivalente de ácido gálico

eq – Equivalente

FRAP – Ferric Reduction Antioxidant Power

g – grama

mg – miligrama

MHA – Mueller-Hinton Agar

MHB – Mueller-Hinton Broth

MIC – Concentração mínima inibitória

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina

NADH – Dinucleótido de adenina e nicotinamida na forma reduzida

NBT²⁺ – Azul de nitrotetrazólio

nm – Nanómetro

PMS – Metossulfato de fenazina

ROS – Espécies reativas de oxigénio

spp – Espécie

TPTZ – 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina

TSA – Trypticase soy agar

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

µg – micrograma

Índice de matérias

1.	Introdução.....	1
1.1	Alfarrobeira e caracterização do seu fruto	1
1.1.1	Valor nutricional e composição de alfarroba	2
1.1.2	Aplicações farmacológicas da alfarroba.....	4
1.2	Antioxidantes e <i>stress</i> oxidativo	5
1.2.1	Antioxidantes na cosmética.....	6
1.3	Compostos fenólicos	7
1.3.1	Atividade mutagénica e antimutagénica de polifenóis	9
1.3.2	Atividade antimicrobiana de polifenóis	11
1.4	Microrganismos e patologias	12
1.4.1	<i>Bacillus cereus</i>	13
1.4.2	<i>Propionibacterium acnes</i>	14
1.4.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.4.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.4.5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16
1.4.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	16
1.4.7	<i>Escherichia coli</i>	16
1.4.8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
1.4.9	<i>Salmonella enterica</i>	18
1.4.10	<i>Candida albicans</i>	18
1.5	Objetivos.....	20
2.	Materiais e métodos	21
2.1	Reagentes e meios de cultura.....	21
2.2.	Preparação dos extratos de alfarroba	21
2.3.	Quantificação do teor em fenóis totais	22
2.4.	Quantificação de Flavonoides Totais	23
2.5.	Determinação da atividade antioxidante	23
2.5.1.	Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH*	23
2.5.2.	Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP	24
2.5.3	Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC	25
2.5.4.	Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido	26
2.6.	Determinação da atividade antimicrobiana	28
2.6.1.	Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em agar	28
2.6.2.	Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em meio líquido	29
2.7.	Avaliação da atividade mutagénica através do Teste de Ames.....	30

2.7.1. Caracterização das estirpes utilizadas.....	30
2.7.2 Realização experimental do Teste de Ames.....	31
2.8. Análise Estatística	32
3. Resultados e Discussão	33
3.1. Determinação dos fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu.....	33
3.2. Quantificação dos Flavonoides Totais	34
3.3. Determinação da atividade antioxidante dos constituintes da alfarroba.....	36
3.3.1 Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH*	36
3.3.2 Determinação da atividade antioxidante por sequestro do radical anião superóxido.....	38
3.3.3 Determinação da atividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP	42
3.4. Determinação da redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC	44
3.5 Determinação da atividade antimicrobiana	45
3.5.1 Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em agar	45
3.5.2 Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em meio líquido.....	52
3.6. Avaliação da atividade mutagénica através do Teste de Ames.....	54
4. Conclusão.....	57
5. Referências Bibliográficas	59

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Vagem inteira da alfarroba, produto de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	1
Figura 1.2 - Aspeto do grão de alfarroba.....	2
Figura 1.3 - Estrutura de alguns compostos fenólicos (Adaptado de Apak <i>et al.</i> , 2007)	7
Figura 1.4 - Unidades monoméricas de taninos condensados (catequina e galocatequina) e taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico). (Adaptado de Patra e Saxena, 2011)	8
Figura 2.1 – Reação de desativação do radical DPPH [•] (Moon e Shibamoto, 2009).	24
Figura 2.2 - Reação de formação do complexo Fe ²⁺ -TPTZ após redução de Fe ³⁺ devido à ação de um antioxidante (adaptado de Prior <i>et al.</i> , 2005).	25
Figura 2.3 - Redução do complexo Cu(II)-neocuproína a Cu(I)-neocuproína, por ação dos antioxidantes da amostra (adaptado de Apak <i>et al.</i> , 2004).	26
Figura 2.4 - Redução do NBT ²⁺ (A) pelo radical anião superóxido, originando azul de formazano (B), doseado espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 560 nm	27
Figura 2.5 - Reações de formação do radical anião superóxido através do sistema PMS/NADH (Nakamura <i>et al.</i> , 1992).	27
Figura 3.1 - Teor em compostos fenólicos totais nas diferentes amostras testadas	33
Figura 3.2 - Teor em flavonoides totais nas diferentes amostras testadas.....	35
Figura 3.3 - Percentagem de inibição em função da quantidade de amostra para os diferentes extratos analisados.....	36
Figura 3.4 - Valores de IC ₅₀ obtidos nas diferentes amostras testadas.	37
Figura 3.5 - Valores da capacidade de sequestro do radical DPPH nas diferentes amostras	38
Figura 3.6 - Variação da absorvância em função do tempo, na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de grão	39
Figura 3.7 - Variação da absorvância em função do tempo, na presença de diferentes concentrações de extrato aquoso de polpa	39
Figura 3.8 - Variação da absorvância em função do tempo, na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico misto.....	40
Figura 3.9 - Variação da absorvância em função do tempo, na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de polpa.....	40
Figura 3.10 - Percentagem de inibição em função da quantidade de amostra na mistura reacional, para os diferentes extratos analisados (A) extrato etanólico de grão; (B) extrato etanólico misto; (C) extrato aquoso de polpa; (D) extrato etanólico de polpa	41
Figura 3.11 - Resultados obtidos através do ensaio FRAP nas diferentes amostras testadas.....	43
Figura 3.12 - Resultados obtidos através do ensaio CUPRAC nas diferentes amostras testadas.....	44
Figura 3.13 - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A), polpa aquoso (B), polpa etanólico (C) e misto etanólico (D) para <i>Bacillus cereus</i>	47
Figura 3.14 - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A) e polpa aquoso, polpa etanólico e misto etanólico (B) para <i>Candida albicans</i>	47

Figura 3.15 - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A), polpa aquoso (B), polpa etanólico (C) e misto etanólico (D) para a <i>Enterococcus faecalis</i>	48
Figura 3.16 - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A), polpa aquoso (B), polpa etanólico (C) e misto etanólico (D) para <i>Listeria monocytogenes</i>	48
Figura 3.17 - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A), polpa aquoso, polpa etanólico e misto etanólico (B) para <i>S. aureus</i> resistente à meticilina.....	49
Figura 3.18 - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A), polpa aquoso (B), polpa etanólico (C) e misto etanólico (D) para <i>Propionibacterium acnes</i>	49
Figura 3.19 - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A), polpa aquoso (B), polpa etanólico (C) e misto etanólico (D) para <i>Staphylococcus aureus</i>	50
Figura 3.20 - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A), polpa aquoso (B), polpa etanólico (C) e misto etanólico (D) para <i>Staphylococcus epidermidis</i>	50
Figura 3.21 - Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão, polpa aquoso, polpa etanólico e misto etanólico para <i>Salmonella entérica</i> (A), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B) e <i>Escherichia coli</i> (C).....	51

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Composição nutricional e química de farinha de alfarroba por 100 g (Adaptado USDA, 2018).....	3
Tabela 1.2 - Composição em compostos fenólicos de farinha de alfarroba (Adaptado de Youssef <i>et al.</i> , 2013).....	4
Tabela 2.1 - Composição do top agar por litro (Maron e Ames, 1983)	31
Tabela 2.2 - Composição do meio VB (por litro) (Maron e Ames, 1983).....	32
Tabela 3.1 - Valores de EC50 obtidos na determinação da capacidade de sequestro do superóxido nas diferentes amostras	41
Tabela 3.2 - Diâmetro dos halos de inibição obtidos através do método de difusão em agar com as diferentes concentrações dos extratos em estudo.....	46
Tabela 3.3 - Concentração mínima inibitória para o extrato etanólico de grão	53
Tabela 3.4 - Número de revertentes/placa verificados com a estirpe TA100 em presença de diferentes quantidades de extrato	54
Tabela 3.5 - Número de revertentes/placa verificados com a estirpe TA102 em presença de diferentes quantidades de extrato	54

1. Introdução

1.1 Alfarrobeira e caracterização do seu fruto

A *Ceratonia siliqua* L., mais comumente conhecida como alfarrobeira, é uma árvore de folha perene da família de leguminosas *Fabaceae* que pode ser encontrada na maioria dos países mediterrâneos e do norte de África (incluindo Tunísia, Argélia e Marrocos), usualmente em locais de clima temperado e seco com solos pobres (Bernado-Gil *et al.*, 2011) e que exibe uma grande heterogeneidade genética, dependendo da sua origem geográfica (Rtibi *et al.*, 2017). Esta planta é cultivada em Portugal há já muitos anos, sendo que, em 2016, Portugal apresentava-se como o segundo maior produtor de alfarrobeira a nível mundial (Roseiro *et al.*, 2013; FAOSTAT, 2016) com uma produção de aproximadamente 40 mil toneladas de alfarroba, apenas atrás da Espanha, com uma produção de cerca de 70 mil toneladas, o que torna o estudo das características e propriedades dos produtos da alfarrobeira extremamente importante para um melhor aproveitamento desta árvore e do seu fruto.

As folhas da alfarrobeira possuem 3 a 7 cm de comprimento, e são ricas em polifenóis em geral e em flavonoides em particular (Rtibi *et al.*, 2017). A alfarroba, fruto da alfarrobeira, é uma vagem de cor acastanhada ligeiramente curvada que, quando madura, possui 10 a 25 cm de comprimento (figura 1.1), sendo constituída por cerca de 90 % de polpa e 10 % de grão ou semente. O grão (figura 1.2) possui uma película exterior de cor castanha (30-33% do seu peso), um endosperma branco e translúcido (42-46% do seu peso) e o gérmen (23-25% do seu peso) (Dakia *et al.*, 2008; Ritbi *et al.*, 2017).



Figura 1.1 - Vagem inteira da alfarroba, produto de *Ceratonia siliqua* L.



Figura 1.2 – Aspeto do grão de alfarroba

1.1.1 Valor nutricional e composição de alfarroba

O valor de um alimento relaciona-se com os seus conteúdos nutricionais e com a sua digestibilidade, bem como com a presença ou ausência de fatores tóxicos (Ritbi *et al.*, 2017). Os alimentos não só oferecem nutrientes essenciais como outros compostos bioativos importantes na promoção da saúde e prevenção de doenças. Têm sido encontradas fortes correlações entre uma dieta saudável (sem excesso de energia, rica em frutos, vegetais e grãos integrais, e pobre em gorduras saturadas, sódio e açúcares refinados) e a diminuição do risco de doenças crónicas e degenerativas (Sofi e Dinu, 2016).

Devido à sua composição única, abundância em carboidratos, fibra, compostos fenólicos e outros compostos bioativos, a alfarroba possui um grande potencial para ser utilizada como ingrediente funcional na produção de produtos alimentícios (Benkovic *et al.*, 2017). As vagens de alfarroba contêm entre 40 a 60 % de carboidratos, compostos polifenólicos, especialmente taninos (18 a 20 %), minerais, tais como o potássio, sódio, ferro, cobre, manganês e zinco, e uma pequena quantidade de proteínas (3 a 4%). Este fruto é reconhecido especialmente pela sua riqueza em açúcares, essencialmente compostos por sacarose (32-38%), frutose (5-7%) e glucose (5-6%), sendo as suas proporções variáveis (Karababa e Coskuner, 2013; Ritbi *et al.*, 2017). Vários estudos realizados recorrendo à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) para a determinação do perfil em compostos fenólicos da alfarroba revelaram a presença de taninos condensados (proantocianidinas), ácido gálico, catequina, epicatequina galato, epigallocatequina galato e glicosídeos de quercetina. As substâncias químicas na alfarroba podem diferir largamente, de acordo com a espécie, clima e estado de maturação do fruto (Ritbi *et al.*, 2017).

A semente é a fração da alfarroba mais utilizada industrialmente na produção de goma de alfarroba ou extrato de goma de alfarroba. A goma proveniente do endosperma da semente de alfarroba é um polissacárido – a galactomanana – que é utilizada não só na indústria alimentar, como aditivo natural (E410), como também nas indústrias farmacêutica, cosmética e têxtil devido às suas propriedades espessantes, emulsificantes e estabilizantes (Bernardo-Gil *et al.*, 2011; Karababa e Coskuner, 2013). A produção de goma de alfarroba gera dois subprodutos: o gérmen da semente e o que resta das vagens moídas (polpa da vagem). O gérmen contém uma mistura de proteínas insolúveis em água com propriedades semelhantes ao glúten, que conferem à farinha do gérmen de alfarroba potencial para ser utilizada como suplemento dietético ou como ingrediente em alimentos derivados de

cereais, tendo como população alvo pessoas que sofrem de doença celíaca (Durazzo *et al.*, 2014; Tsatsaragkou *et al.*, 2014).

A polpa da vagem é a fração menos utilizada da alfarroba. Apenas cerca de um terço desta polpa é consumida como alimento para animais ou utilizada para produção de farinha de alfarroba que é utilizada, especialmente, na confeitaria regional, principalmente como substituto do chocolate (Roseiro *et al.*, 2013; Dakia *et al.*, 2017). Para além do seu sabor doce e semelhante ao chocolate, outros benefícios na utilização de farinha de alfarroba são também o seu baixo preço, ausência de cafeína e teobromina e a sua abundância em fibras e compostos bioativos (Benkovic *et al.*, 2017), como por exemplo os polifenóis, particularmente proantocianidinas e galotaninos, que apresentam atividade antioxidante, sendo importantes na proteção do organismo contra a excessiva produção de radicais livres e espécies reativas de oxigénio, que se encontram envolvidas no desenvolvimento de diversas patologias como o Alzheimer e o cancro (Custódio *et al.*, 2011; Roseiro *et al.*, 2013). A composição nutricional da farinha de alfarroba encontra-se apresentada na tabela 1.1, enquanto que na tabela 1.2 se apresentam diversos compostos fenólicos que têm vindo a ser encontrados nesta farinha.

Tabela 1.1 – Composição nutricional e química da farinha de alfarroba por 100 g (Adaptado USDA, 2018).

VALOR NUTRICIONAL POR 100 g DE FARINHA DE ALFARROBA	
Energia (kcal)	222
Proteínas (g)	4,62
Lípidos (g)	0,65
Ácidos gordos saturados, total (g)	0,090
Ácidos gordos monoinsaturados, total (g)	0,197
Ácidos gordos polinsaturados, total (g)	0,216
Açúcares (g)	49,08
Fibra (g)	39,8
Água (g)	3,58
MINERAIS	
Cálcio (mg)	348
Ferro (mg)	2,94
Magnésio (mg)	54
Fósforo (mg)	79
Potássio (mg)	827
Sódio (mg)	35
Zinco (mg)	0,92
VITAMINAS	
Vitamina C (mg)	0,2
Tiamina (mg)	0,053
Riboflavina (mg)	0,461
Niacina (mg)	1,897
Vitamina B6 (mg)	0,366
Folato (mg)	29
Vitamina A (µg)	1
Vitamina E (mg)	0,63

Tabela 1.2 – Composição em compostos fenólicos da farinha de alfarroba (Adaptado de Youssef *et al.*, 2013).

Compostos fenólicos	Ppm
Ácido gálico	10,21
Pirogalhol	4970,18
Ácido protocatecuico	79,47
Ácido cloragénico	101,09
Catequina	27,97
Catecol	164,67
Ácido cinâmico	7,78
Ácido cafeico	48,23
Ácido vanílico	13,92
Ácido ferúlico	10,17

1.1.2 Aplicações farmacológicas da alfarroba

As enfermidades do trato gastrointestinal podem interferir com a digestão de alimentos e líquidos, com a absorção de nutrientes ou com a excreção. Estes distúrbios podem ser provocados por infecções de variados tipos de bactérias, vírus e organismos parasitas (Mathabe *et al.*, 2006; Karki e Tiwari, 2007). O fruto da alfarrobeira tem sido tradicionalmente utilizado no tratamento de perturbações do trato gastrointestinal. O sumo de alfarroba tem, igualmente, sido utilizado no tratamento da diarreia, devido à sua riqueza em eletrólitos. Este fruto tem ainda sido tradicionalmente utilizado como um antitússico e no tratamento de verrugas (Ritbi *et al.*, 2017).

Recentemente, estudos científicos efetuados com os produtos da alfarrobeira indicam que estes possam ter múltiplas atividades farmacológicas, especialmente no trato digestivo, incluindo ação antioxidante, antidiarreica, antibacteriana, anti-inflamatória, anti-ulcerativa, laxante e antidiabética (Kivçak *et al.*, 2002; Ritbi *et al.*, 2015; Ritbi *et al.*, 2016a e b; Ritbi *et al.*, 2017).

A ação antidiarreica pode estar relacionada com ação antimicrobiana contra bactérias envolvidas nas infeções gastrointestinais. Os extratos aquosos da alfarroba têm mostrado ter diferentes ações sobre o trânsito intestinal consoante o seu estado de maturação. Assim, enquanto que os extratos aquosos das vagens não maduras produzem uma diminuição significativa do trânsito gastrointestinal em ratos, os extratos aquosos de vagens maduras possuem uma atividade laxativa. Esta diferença de atividade deverá resultar da diferente composição fitoquímica das vagens nestes dois estádios de maturação (Ritbi *et al.*, 2016a, 2017).

Os extratos aquosos das vagens de alfarroba mostraram inibir todos os parâmetros indicativos da inflamação em ratos tratados com sulfato de dextrano sódico, sugerindo que estes extratos possam ter um efeito anti-inflamatório sobre a mucosa colónica inflamada e plasma em ratos (Ritbi *et al.*, 2016b). Os extratos aquosos preparados a partir dos produtos das folhas e da casca da alfarrobeira mostraram conseguir inibir *in vitro* a atividade das enzimas α -amilase e α -glucosidase envolvidas na libertação da glucose durante a digestão gastrointestinal, o que sugere que estes extratos tenham um potencial antidiabético (Custódio *et al.*, 2015). No mesmo sentido, foi também verificado que extratos da vagem

imatura conseguiam reduzir a glicemia em ratos diabéticos (Ritbi *et al.*, 2017). Os extratos aquosos preparados a partir dos produtos das folhas e da casca da alfarrobeira mostraram, igualmente, conseguir inibir *in vitro* a atividade das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, o que suporta a sua ação sedativa (Custódio *et al.*, 2015).

1.2 Antioxidantes e stress oxidativo

O corpo humano mantém um equilíbrio constante entre a produção de pró-oxidantes, que são gerados no metabolismo celular, e os sistemas de defesa antioxidante. Se este equilíbrio for comprometido, existe uma situação de *stress* oxidativo, caracterizada pelo aumento de espécies reativas e radicais livres, que pode originar danos ou mesmo a morte celular (Halliwell e Gutteridge, 1999; Garay, 2017).

Os radicais livres são espécies químicas que possuem um eletrão desemparelhado. Estas espécies são extremamente reativas, pois têm tendência a captar um eletrão proveniente de moléculas estáveis. Quando essa situação ocorre, a molécula estável torna-se ela própria um radical livre, iniciando-se uma reação em cadeia (Avello e Suwalsky, 2006). Os radicais livres são produzidos no organismo por via de reações bioquímicas de oxidação-redução que ocorrem naturalmente nas células. Em quantidades moderadas, estes elementos possuem efeitos fisiológicos benéficos, como a regulação da resposta imunológica e de defesa (Olguin *et al.*, 2004). Todavia, se a sua produção for excessiva, pode conduzir a lesões celulares que poderão induzir o desenvolvimento de doenças como o cancro, doenças cardiovasculares, desordens neurológicas, diabetes ou envelhecimento (Garay, 2017).

As espécies reativas de oxigénio (ROS), como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HOCl) ou o radical hidroxilo (OH^{\cdot}) possuem uma grande importância na patogénese de diversas doenças humanas (Ramful *et al.*, 2010). A oxidação induzida por ROS pode resultar na desintegração da membrana celular, danos em proteínas e mutações no DNA, o que poderá iniciar ou propagar o desenvolvimento de doenças graves como o cancro, doenças degenerativas como a doença de Alzheimer e doença de Parkinson, artrite, aterosclerose, diabetes, podendo também acelerar o processo de envelhecimento (Magalhães *et al.*, 2008; Moon e Shibamoto, 2009).

De modo a haver um controlo dos níveis destas espécies oxidativas, os diferentes organismos necessitam de possuir sistemas de defesa antioxidante, que incluem dois tipos de antioxidantes: os antioxidantes endógenos (sistemas enzimáticos), que são produzidos no organismo, e os antioxidantes exógenos (por exemplo, vitaminas e compostos fenólicos), que são obtidos através da dieta (Céspedes e Sánchez, 2000). O papel desempenhado por fatores dietéticos no que à saúde respeita tem sido reconhecido ao longo dos tempos, com os estudos epidemiológicos e clínicos a fornecerem uma visão mais clara acerca dos mecanismos fisiológicos dos efeitos dos alimentos bioativos sobre a saúde humana. Muitos dos efeitos positivos atribuídos aos alimentos bioativos parecem estar relacionados com a presença nesses alimentos de compostos com elevada capacidade antioxidante.

1.2.1 Antioxidantes na cosmética

Os estudos relativos às propriedades antienvhecimento de substâncias ativas têm despertado um grande interesse, tendo em consideração o aumento da expectativa do tempo de vida, bem como a procura pela qualidade de vida durante o processo de envelhecimento (Scotti *et al.*, 2007). Conforme já referido, uma das principais razões apontadas como sendo responsável pelo processo de envelhecimento é o desequilíbrio do mecanismo de defesa antioxidante do organismo (Magalhães, 2000). Assim, um dos objetivos da área da cosmética é o de prevenir e atenuar o envelhecimento cutâneo por meio da procura e estudo de substâncias antioxidantes eficazes.

O desequilíbrio do mecanismo de defesa antioxidante do organismo pode provocar danos na pele que são consequência de danos em estruturas como lípidos e proteínas presentes na pele. Cerca de 80% dos sinais visíveis no envelhecimento são causados pelos raios ultravioleta (UV) e pelos radicais livres formados, devido à exposição aos mesmos (Buchli, 2002). A aplicação tópica de antioxidantes reduz os danos oxidativos causados pela radiação UV (Scotti *et al.*, 2007). Entre as substâncias ativas utilizadas em produtos cosméticos com ação antienvhecimento encontram-se os carotenóides, as vitaminas C e E, a glutathione e diversos extratos vegetais. O mecanismo de ação antioxidante dos carotenoides resulta da sua capacidade de neutralização de ROS, reduzindo o *stress* oxidativo, existindo diversos estudos que demonstram os efeitos benéficos dos carotenoides, em especial do β -caroteno (precursor da vitamina A). A sua ingestão oral permite uma redução das lesões celulares, aumentando deste modo a fotoproteção (Fuchs, 1998; Cèsarini *et al.*, 2003). A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel, forte agente redutor, que é capaz de reagir diretamente com os radicais livres. O ácido ascórbico (vitamina C) possui ainda a propriedade de estimular a síntese de colagénio (Fuchs, 1998). A glutathione é um agente redutor de várias enzimas, exercendo a sua ação antioxidante por inibição direta de ROS, atuando ainda como dador de hidrogénio a outros antioxidantes (Scotti *et al.*, 2007). No entanto, a sua absorção por via tópica é muito fraca, o que leva a que resultados em produtos cosméticos sejam mais favoráveis quando obtidos com derivados da glutathione (Okigami, 2001). A atividade antioxidante do α -tocoferol acontece tanto por neutralização das formas radiculares de oxigénio, inibindo a peroxidação lipídica, bem como pela inibição direta da peroxidação lipídica (Okigami, 2001). Os vegetais são ricos em substâncias antioxidantes, que desempenham um papel muito importante nas plantas como proteção natural contra os radicais livres formados pela radiação UV nos tecidos vegetais. Muitos extratos vegetais possuem compostos, entre os quais se destacam os polifenóis, que têm capacidade de neutralizar a atividade radicalar, diminuindo deste modo lesões celulares (Nikolic, 2006; Scotti *et al.*, 2007).

1.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos de diversas plantas, e têm uma importante contribuição nas características organoléticas dos alimentos, tais como a cor, o sabor ou o aroma (Karakaya, 2004). Estes compostos são encontrados em produtos de origem vegetal, podendo, por isso ser encontrados em frutas, legumes, cereais, especiarias, leguminosas, chá, café, etc. Estes compostos podem ser divididos em ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas e taninos (Ferreira e Abreu, 2007) (figura 1.3), sendo os ácidos fenólicos e os flavonoides os mais abundantes na dieta.

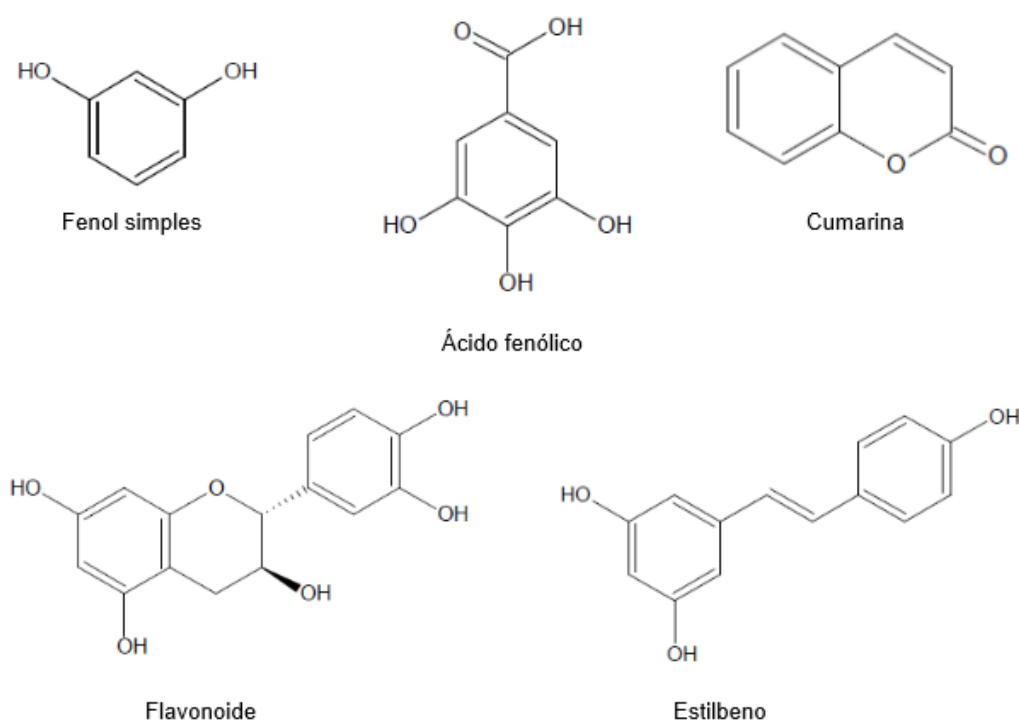


Figura 1.3 – Estrutura de alguns compostos fenólicos (Adaptado de Apak *et al.*, 2007)

Os ácidos fenólicos classificam-se em ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, podendo ser encontrados sob diversas formas, tais como ácidos fenólicos livres, ésteres ou glucosídeos. A sua capacidade antioxidante depende do número e de grupos hidroxilo ligados ao anel aromático, sítio de ligação e posição relativa dos grupos ligados, bem como do tipo de substituintes (Weichselbaum e Buttriss, 2010).

Os flavonoides são uma classe extensa de substâncias fenólicas que se encontra amplamente distribuída no reino vegetal, e que pode ser encontrada em vários locais das plantas, desde as raízes, até às flores e frutos, sendo encontradas no interior dos vacúolos das células. Podem encontrar-se nos alimentos principalmente como glucosídeos, mas também na sua forma livre (agliconas). Os flavonoides dividem-se em várias classes: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (catequinas),

antocianidinas e isoflavonas (Weichselbaum e Buttriss, 2010). Os flavonoides têm a capacidade de modular a peroxidação lipídica envolvida na aterogênese, trombose e carcinogênese. As suas propriedades reconhecidas incluem elevada atividade antioxidante, inibição de enzimas hidrolíticas e oxidativas e ação anti-inflamatória (Zhishen *et al.*, 1999).

Os taninos são polifenóis de origem vegetal, solúveis em água e com um peso molecular relativamente elevado (de 500 a 3000 unidades de massa atômica) (Serrano *et al.*, 2009). Estes compostos possuem a capacidade de formar complexos com proteínas e carboidratos (Patra e Saxena, 2011). Devido à sua capacidade de complexação de íons metálicos e de sequestro de radicais livres os taninos são, igualmente, importantes agentes antioxidantes.

Os taninos dividem-se principalmente em dois grandes grupos: os taninos hidrolisáveis (HTs) e os taninos condensados (CTs, também conhecidos como proantocianidinas). Os taninos hidrolisáveis são moléculas complexas com um poliol como núcleo central, como a glucose, glucitol e ácidos quínicos ou quercitol. Estes compostos são suscetíveis à hidrólise por ácidos, bases ou esterases, produzindo um poliol e os seus ácidos fenólicos constituintes. Os taninos condensados, ou proantocianidinas, são principalmente polímeros de unidades de catequinas como a epicatequina e epigalocatequina (figura 1.4).

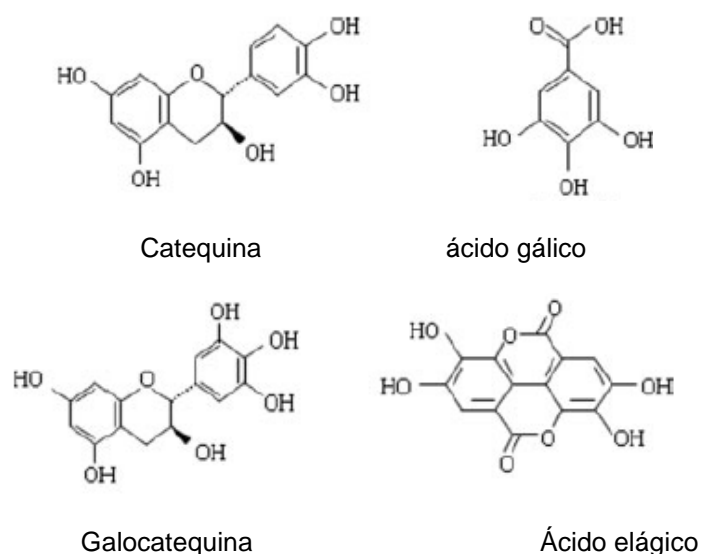


Figura 1.4 – Unidades monoméricas de taninos condensados (catequina e galocatequina) e taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico). (Adaptado de Patra e Saxena, 2011).

Os polifenóis têm demonstrado exercer a sua atividade antioxidante através de mecanismos de transferência eletrônica, mecanismos de transferência de átomos de hidrogénio e quelação de metais de transição. Certos polifenóis têm-se revelado capazes de induzir enzimas de fase II, tais como a glutathione-S-transferase (GST), conduzindo a um aumento da excreção de espécies oxidativas, ou de induzir as enzimas antioxidantes, ao mesmo tempo que se revelam capazes de inibir a ação de enzimas oxidativas como os citocromos P450, ciclooxigenases ou lipoxigenases. Para além das

propriedades antioxidantes, muitos polifenóis apresentam igualmente propriedades anti-inflamatórias, antimutagênicas e/ou anticarcinogênicas, *in vitro* ou em sistemas animais, havendo uma correlação entre o consumo de antioxidantes polifenólicos e a redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, bem como de determinados tipos de cancro (Ferguson, 2001).

As atividades biológicas dos compostos fenólicos são dependentes do seu comportamento no trato digestivo. Estes compostos possuem biodisponibilidade limitada, podendo ser amplamente metabolizados. Contudo, apesar de quantidades menores serem absorvidas pelo organismo, é sugerido que essas quantidades menores sejam suficientes para exercer efeitos benéficos na saúde humana (Williamson e Manach, 2005). A biodisponibilidade pode ser definida como a extensão na qual um composto é absorvido, ficando disponível num determinado órgão. A biodisponibilidade de uma substância depende das suas características, como a sua solubilidade, permeabilidade, estabilidade no trato gastrointestinal e biotransformação antes de atingir a circulação sanguínea, uma vez ingerida por via oral (Ratnam *et al.*, 2006). A biodisponibilidade dos diferentes grupos de polifenóis difere entre si, e aqueles que existem em maiores quantidades não são necessariamente aqueles com maior disponibilidade. Durante a digestão gastrointestinal, os polifenóis podem combinar-se com outros ingredientes dos alimentos, tais como açúcares, lípidos e fibras, reduzindo ou aumentando a sua biodisponibilidade (Rtibi *et al.*, 2017). Os ácidos fenólicos de baixo peso molecular, como o ácido gálico e as isoflavonas, parecem ser facilmente absorvidos, seguidos pelas catequinas, flavanonas e glicosídeos de quercetina, sendo as proantocianidinas, as catequinas galato do chá e as antocianinas os polifenóis de mais difícil absorção (Manach *et al.*, 2005; Rasteiro, 2012; Rtibi *et al.*, 2017).

1.3.1 Atividade mutagénica e antimutagénica de polifenóis

Apesar da sua forte atividade antioxidante, os polifenóis podem em determinadas condições, como por exemplo na presença de óxido nítrico ou quando presentes em doses elevadas, atuar como pró-oxidantes. Alguns compostos fenólicos podem gerar radicais secundários reativos capazes de oxidar proteínas e lípidos. Radicais hidroxilo derivados de flavonoides semelhantes à quercetina iniciam a peroxidação lipídica nas membranas celulares e causam danos ao nível do DNA (Ferguson, 2001). As mutações em células somáticas não só se encontram envolvidas no processo da carcinogénese, mas também desempenham um importante papel na patogénese de outras doenças degenerativas crónicas, tais como a aterosclerose e doenças cardíacas, principais causas de morte na população humana (De Flora *et al.*, 1996).

Se por um lado, alguns estudos indicam que alguns polifenóis, particularmente a quercetina, possam ter atividade mutagénica, por outro, a maioria destes ensaios apontam no sentido destes compostos terem uma atividade antimutagénica e anticancerígena (Ferguson, 2004). Os mecanismos de ação dos agentes antimutagénicos podem ser classificados como desmutagénese, em que estes agentes atuam diretamente sobre os compostos que induzem mutações no DNA, inativando-os, e a bio-antimutagénese, onde os agentes antimutagénicos atuam sobre o processo que leva a indução de mutações, ou na reparação das lesões causadas no DNA (Antunes e Araújo, 2000). Os compostos

fenólicos podem exercer os seus efeitos antimutagénicos através de diferentes mecanismos tais como (Flora, 1998):

Inibição das reações de nitroação – As *N*-nitrosaminas podem formar-se no estômago a partir de componentes dos alimentos. Muitos destes compostos têm demonstrado ser cancerígenos em animais de laboratório. Diversos compostos fenólicos como o catecol, ácido cinâmico, ácido cloragénico, ácido gálico e taninos têm demonstrado ser capazes de inibir a formação destes compostos.

Inibição das reações de bioativação – Os flavonoides conseguem inibir a ativação dos agentes cancerígenos por inibirem as enzimas envolvidas nestas reações, nomeadamente os citocromos P450.

Captura de eletrófilos por reação química ou conjugação catalisada por enzimas – Polifenóis como os flavonoides, os taninos e o ácido elágico podem realizar este mecanismo de proteção contra agentes mutagénicos.

Atividade antioxidante e eliminação de espécies reativas de oxigénio

Indução de apoptose celular – os flavonoides encontram-se envolvidos neste processo de proteção celular.

Modulação da transdução de sinal – compostos como os flavonoides conseguem efetuar este processo.

A atividade antimutagénica dos polifenóis pode desempenhar um papel importante na proteção do sistema gastrointestinal de diversos compostos presentes nos alimentos e ingeridos pelo Homem que possuem efeitos mutagénicos e carcinogénicos, ou seja, que podem induzir mutações no DNA ou favorecer o desenvolvimento de tumores. É sabido que a dieta possui um papel muito relevante para o desenvolvimento do cancro, sendo que se estima que cerca de um terço dos cancros humanos possam estar relacionados com os hábitos alimentares (Antunes e Araújo, 2000).

Os compostos mutagénicos podem ser constituintes naturais dos alimentos, podem ser contaminantes ambientais que se acumulam nos alimentos, podem ser compostos produzidos por microrganismos que contaminam os alimentos, podem ser intencionalmente adicionados, ou podem ainda ser produzidos nos processos de confeção ou conservação dos alimentos (Ferguson e Philpott,

2008). Entre os compostos capazes de induzir mutações na molécula de DNA encontram-se, por exemplo, a aflatoxina B₁, alguns alcaloides pirrolizidínicos, aminas heterocíclicas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e as N-nitrosaminas, bem como os produtos das reações de Maillard.

Os alcaloides pirrolizidínicos são compostos comuns presentes em plantas que podem ser utilizadas na alimentação ou na preparação de infusões (Liu, 2016). A aflatoxina B₁, por sua vez, é um composto produzido por fungos, o *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que podem crescer em cereais e frutos secos, quando armazenados de forma indevida. A exposição à aflatoxina B₁ encontra-se associada a hepatocarcinomas, principalmente quando associada à infecção pelo vírus da hepatite B (Qi *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2007). As aminas heterocíclicas são substâncias produzidas quando alimentos como carne ou peixe são expostos a temperaturas mais elevadas (superiores a 150 °C), durante a sua confeção (Szterk, 2015; Sepahpour *et al.*, 2018). As N-nitrosaminas podem ser encontradas principalmente em alimentos como carnes processadas. Podem também ser sintetizadas no estômago a partir do nitrito e de aminas existentes nos alimentos (Mestankova *et al.*, 2014). Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos podem formar-se nos alimentos aquando da sua confeção a temperaturas elevadas e, do mesmo modo, por existirem naturalmente no ambiente, sendo produtos da combustão incompleta de material orgânico (Agudelo-Castañeda *et al.*, 2017). Por fim, e como resultado das reações de Maillard, que ocorrem durante a confeção a temperatura elevada temperatura (acima dos 100 °C) de alimentos ricos em açúcares, podem formar-se compostos provavelmente cancerígenos como é o caso da acrilamida (Sung *et al.*, 2018).

1.3.2 Atividade antimicrobiana de polifenóis

Atualmente, e cada vez mais, existe uma maior procura de produtos seguros e com uma elevada qualidade, bem como uma crescente preocupação relativamente à saúde e doenças de origem alimentar, causadas por diversos microrganismos (Tajkarimi *et al.*, 2010; Leandro, 2015). A inibição do crescimento destes microrganismos patogénicos causadores de doenças, e também da deterioração de alimentos, é conseguida através da utilização de conservantes químicos e antimicrobianos não naturais. No entanto, a procura por produtos mais saudáveis e naturais leva a que haja um aumento do interesse no que diz respeito à utilização de compostos antimicrobianos naturais que permitam a preservação de alimentos. Para além da indústria alimentar este interesse abrange igualmente outras indústrias como a farmacêutica ou a cosmética (Shan *et al.*, 2007).

Tal como nos alimentos, os conservantes são, igualmente, indispensáveis em produtos cosméticos para prevenir o crescimento de microrganismos e a subsequente deterioração dos produtos. No entanto, apesar de serem geralmente não tóxicos, juntamente com as fragrâncias os conservantes estão entre as causas mais comuns de dermatite de contacto, pelo que existe uma grande procura por conservantes naturais para aplicação em formulações cosméticas (Maurício *et al.*, 2017).

Os antimicrobianos naturais, além de poderem possuir as características de conservação e segurança, reduzem o desenvolvimento de resistências a certo tipo de antibióticos por parte dos

microrganismos patogênicos (Tajkarimi *et al.*, 2010; Leandro, 2015). O surgimento de bactérias com resistência aos antibióticos é uma séria ameaça na luta contra as doenças infecciosas. Para resolver este problema, a indústria farmacêutica tem vindo a desenvolver antibióticos mais poderosos. No entanto, este processo pode ter um sucesso temporário e, eventualmente, contribuir para o desenvolvimento de maior resistência. Assim, há uma necessidade extrema de identificar novos compostos naturais com atividade antimicrobiana elevada, com estruturas químicas diversas e novos mecanismos de ação, que possam vir a substituir os antibióticos. Os maiores desafios incluem encontrar compostos com concentrações inibitórias mínimas suficientemente baixas, pouca toxicidade e facilidade de biodisponibilidade para uso eficiente e seguro no Homem e em animais (Bilal *et al.*, 2017).

Entre os constituintes responsáveis pelas propriedades antimicrobianas de produtos naturais, como as plantas aromáticas ou os frutos, encontram-se os compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos, os flavonoides, os taninos, entre outros (Makwana *et al.*, 2015). Vários estudos apontam para que estes compostos possam interferir com a integridade da membrana celular inviabilizando assim a sobrevivência das células. Esta interferência pode ocorrer através da alteração da permeabilidade de membrana, permitindo assim a passagem de agentes nocivos para o interior da célula. Outra possibilidade é a capacidade de os compostos fenólicos conseguirem afetar a síntese do peptidoglicano, contribuindo para a perda de rigidez da célula e alterando assim a sua forma. Outros mecanismos de ação dos compostos fenólicos incluem a inibição da síntese de DNA, de ácido ribonucleico (RNA) e ainda da síntese proteica e lipídica. Também a inibição de enzimas, como a NADH-citocromo c redutase ou a interferência com proteínas da membrana (por exemplo, ATPase) têm sido identificados como mecanismos de atividade bacteriana de compostos fenólicos (Orsi *et al.*, 2006; Bilal *et al.*, 2017).

A capacidade antimicrobiana dos compostos fenólicos parece relacionar-se com os grupos hidroxilo presentes nos mesmos, pois estes possuem a capacidade de interagir com as membranas celulares de bactérias, conseguindo neutralizá-las. Apesar desta interação existir, o comportamento destes compostos não é igual para todas as bactérias. As bactérias gram-positivas são mais sensíveis que as bactérias gram-negativas, devido à constituição das suas paredes. Uma vez que as bactérias gram-negativas possuem lipopolissacáridos na sua membrana externa, são capazes de restringir a disseminação de compostos hidrofóbicos (Tajkarimi *et al.*, 2010).

1.4 Microrganismos e patologias

Microrganismos são organismos apenas visíveis ao microscópio que incluem diversos grupos, entre os quais se destacam as bactérias e os fungos. Os microrganismos tanto podem ser benéficos como prejudiciais para as outras espécies. Podem existir em simbiose com outro organismo, trazendo-lhe benefícios, ou podem ser prejudiciais, transmitindo doenças devido à sua ingestão ou das suas toxinas (Ray, 2004).

As bactérias são organismos unicelulares, que podem ter uma forma de bastonete, ser esféricas ou curvadas. Podem encontrar-se isoladas ou formar agregados, e podem ou não ser móveis. Dividem-se em dois grupos: as bactérias gram-positivas (como, por exemplo, géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Listeria*) e as bactérias gram-negativas (como, por exemplo, os géneros *Escherichia*, *Salmonella* e *Pseudomonas*), que são distinguíveis devido à constituição da sua parede celular. As bactérias gram-positivas possuem uma parede celular com uma elevada quantidade de peptidoglicano, contrariamente às bactérias gram-negativas que possuem uma parede celular mais complexa, composta por uma membrana exterior, que é constituída por lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e fosfolípidos e por uma camada mais fina de peptidoglicano (Ray, 2004).

Os fungos são organismos eucariotas que se dividem em leveduras e fungos filamentosos, e que possuem células com um núcleo individualizado contendo cromossomas. As leveduras constituem um tipo de fungo unicelular, que possui um papel importante na produção de alimentos, bem como na sua deterioração. Os fungos filamentosos, comumente chamados de bolores, são organismos pluricelulares que produzem um elevado número de esporos que se difundem facilmente (Adams e Moss, 2008). Os fungos filamentosos possuem uma grande importância na produção e na deterioração dos alimentos, e as suas micotoxinas podem provocar intoxicações alimentares, podendo ser cancerígenas, como é o caso da aflatoxina B₁, ou causar toxicidade em órgãos específicos (Ray, 2004).

Quando se pretende estudar o potencial antimicrobiano de extratos naturais com vista à sua aplicação como conservante alimentar deve avaliar-se a sua ação contra microrganismos envolvidos na deterioração de alimentos ou microrganismos patogénicos transmitidos pelos alimentos. Por outro lado, quando esta avaliação visa a incorporação em produtos cosméticos devem ser preferencialmente utilizados microrganismos envolvidos na deterioração de cosméticos e nas infeções da pele.

1.4.1 *Bacillus cereus*

As espécies de *Bacillus* compreendem organismos termófilos (organismos adaptados a ambientes com temperaturas extremamente elevadas) e psicrófilos (organismos adaptados a ambientes com temperaturas baixas), o que lhes permite colonizar uma ampla gama de ambientes (Guinebretière *et al.*, 2013). *Bacillus cereus* é uma bactéria gram-positiva formadora de esporos frequentemente encontrada numa ampla variedade de alimentos e condições ambientais. Os seus esporos germinam quando em contacto com matéria orgânica ou no interior de um inseto ou animal hospedeiro (Bottone, 2010). É uma bactéria patogénica alimentar que pode causar intoxicação alimentar do tipo diarreico ou emético (Kim *et al.*, 2011; Guinebretière *et al.*, 2013). A intoxicação alimentar diarreica é causada por enterotoxinas como a hemolisina BL (HBL), a enterotoxina não hemolítica (NHE) e a citotoxina K (CytK), que são produzidas durante o crescimento vegetativo da bactéria no intestino delgado (Bottone, 2010). Os sintomas incluem dor abdominal e diarreia, e podem ocorrer entre 8 a 16 horas após a ingestão de alimentos contaminados (Kim *et al.*, 2011).

A intoxicação alimentar emética é causada por uma toxina emética, um péptido cíclico conhecido por cereulida, que é produzida em produtos alimentares e ingerido pré-formado (Bottone,

2010). Os sintomas são caracterizados por vômitos e náuseas e ocorrem entre uma a 5 horas após a ingestão de alimentos contaminados (Kim *et al.*, 2011).

Além de intoxicação alimentar, o *Bacillus cereus* causa um grande número de infecções locais e sistêmicas em grupos imunologicamente comprometidos e indivíduos imunocompetentes. Entre os mais frequentemente infetados incluem-se recém nascidos, indivíduos consumidores de drogas intravenosas e pacientes com feridas traumáticas ou cirúrgicas. O espectro de infecções inclui o sistema nervoso central, endoftalmite, pneumonia e infecções cutâneas (Bottone, 2010).

1.4.2 *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes é uma bactéria gram-positiva anaeróbica aerotolerante, que pertence ao microbiota natural da pele, e que reside nos folículos pilosebáceos da pele humana, existindo principalmente na face, tórax e axilas, cavidade oral, trato intestinal e canal auditivo externo (Perry e Lambert, 2011; Bacle *et al.*, 2017).

Foi desde sempre considerado um organismo comensal, isto é, um organismo que estabelece uma relação ecológica intraespecífica com outro organismo, beneficiando do mesmo, sem o prejudicar significativamente (Levy *et al.*, 2008). Esta bactéria é reconhecida como relevante nos mecanismos fisiopatológicos de acne. No entanto, um número crescente de estudos tem associado este organismo como sendo um patogénico responsável por uma ampla gama de condições inflamatórias e infecções pós-cirúrgicas (Perry e Lambert, 2011). De facto, *Propionibacterium acnes* é usualmente isolado de acne inflamatório ou da pele, mas tem sido igualmente encontrado em casos de infecções articulares prostéticas, endocardite, endoftalmite, osteomielite e infecções do sistema nervoso central. Pode também ser relevante em casos de sarcoidose e cancro da próstata (Grange *et al.*, 2017).

1.4.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa e não formadora de esporos. É uma bactéria psicrotrófica (Ray, 2004; Carpentier e Cerf, 2011), e o seu crescimento acontece a temperaturas entre os 0 °C e os 42 °C (Farber e Peterkin, 1991; Adams e Moss, 2008). Existe em diversos meios ambientais, tais como ambientes de água salgada, água doce, solo, esgoto e vegetação em decomposição. O transporte animal e humano assintomático é também comum com relatos de isolamento do organismo nas fezes de bovinos, suínos, ovinos, aves, moscas, entre outros.

A sua existência em diversos meios ambientais sugere que a exposição do ser humano à *L. monocytogenes* é frequente. A incidência de infeção é, no entanto, reduzida, uma vez que uma infeção invasiva acontece apenas se o individuo suscetível for exposto a uma dose suficientemente elevada da estirpe virulenta (Adams e Moss, 2008). Este organismo é recorrentemente encontrado em superfícies da indústria alimentar, nomeadamente em instalações refrigeradas, mesmo que rotineiramente limpas e desinfetadas (Carpentier e Cerf, 2011). A sua ampla distribuição no meio ambiente e a sua capacidade de crescer na maioria dos alimentos não ácidos oferece à *L. monocytogenes* diversas oportunidades para se inserir na cadeia alimentar e se multiplicar.

O período de incubação para a doença causada pela *L. monocytogenes* varia entre 1 e 90 dias, com um período típico de incubação de algumas semanas, o que faz com que a identificação do alimento veículo de infecção seja extremamente difícil. Os sintomas da doença, que se desenvolvem principalmente em grávidas, crianças ou idosos e ainda indivíduos imunocomprometidos, variam desde sintomas semelhantes aos de gripe, a meningite e meningoencefalite (Adams e Moss, 2008). A listeriose é usualmente caracterizada por septicemia, meningite e meningoencefalite, mas pode incluir também endocardite. A listeriose tem uma elevada taxa de mortalidade, entre os 20% a 30% (Carpentier e Cerf, 2011).

1.4.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva, com células de forma esférica a ovoide e é anaeróbia facultativa (Ray, 2004). É uma bactéria mesófila, com uma temperatura de crescimento desde os 7 °C aos 48 °C, com um crescimento ótimo aos 37 °C. A produção de enterotoxinas por *Staphylococcus aureus* ocorre num intervalo limitado de temperatura, entre os 35 °C e os 40 °C. É tolerante ao sal e a uma atividade de água reduzida.

O principal habitat desta bactéria é a pele, as glândulas da pele e as membranas mucosas em animais de sangue quente. Nos humanos, é particularmente associada com o trato nasal, sendo encontrada em 20% a 50% de indivíduos saudáveis (Adams e Moss, 2008; Tong *et al.*, 2015). Esta bactéria é isolada de fezes e esporadicamente a partir de uma ampla variedade de outros locais ambientais como solo, ambientes de água salgada ou doce, superfícies de plantas, pó e o ar (Ray, 2004). Embora seja normalmente um parasita inofensivo para o humano, onde desempenha um importante papel no metabolismo dos produtos de pele e possivelmente na prevenção da colonização da pele por agentes patogénicos, pode causar abscessos na pele como furúnculos e ser um patogénico oportunista quando a barreira da pele é violada ou a resistência do hospedeiro está diminuída (Adams e Moss, 2008; Tong *et al.*, 2015).

A intoxicação por *Staphylococcus aureus* é caracterizada por um curto período de incubação, tipicamente entre 2h a 4h. Os sintomas predominantes são náuseas, vômitos, cólicas e prostração. Por vezes também existe diarreia, e a recuperação acontece normalmente entre 1 a 2 dias. A presença de pequenos números de *Staphylococcus aureus* em alimentos não é incomum. Ocorre naturalmente em aves e outras carnes cruas como um componente da microflora da pele. Da mesma forma, pode ser isolado de leite não pasteurizado (Ray, 2004). A contaminação por indivíduos manipuladores de alimentos é também uma ocorrência frequente desta bactéria, face à elevada taxa de transporte humano.

A metilina foi introduzida em 1959 com vista ao tratamento de infeções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina. No entanto, poucos anos mais tarde, esta bactéria adquiriu, igualmente, resistência à metilina. A *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) passou então a ser um problema sério especialmente em ambientes hospitalares. É uma bactéria multirresistente e apenas suscetível a antibióticos glicopeptídicos como a vancomicina e a teicoplanina (Enright *et al.*, 2002). O facto da MRSA se encontrar bem adaptada a todos os ambientes hospitalares

contribui para a sua patogenicidade, podendo causar infecções que variam de abscessos na pele, a pneumonia e endocardite (Hidayat *et al.*, 2006), podendo ainda causar complicações mais severas como infecções do sistema nervoso central (Liu *et al.*, 2011).

1.4.5 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis é uma bactéria gram-positiva que constitui um componente na microflora natural da pele humana (Dubin *et al.*, 2001). Esta bactéria é a que mais comumente se encontra na pele e, como resultado, muitas vezes aparece como contaminante em amostras de sangue (Moon *et al.*, 2001). No entanto, *S. epidermidis* é também reconhecida como patogénico, infectando indivíduos imunocomprometidos ou com dispositivos estranhos ao organismo, como cateteres, *shunts* ou implantes artificiais (Dubin *et al.*, 2001; Moon *et al.*, 2001). Esta bactéria pode causar furúnculos, abscessos, endocardite e outras patologias associadas ao estado de imunossupressão.

Este organismo é também um suspeito patogénico oral, frequentemente isolado em indivíduos com periodontite. O principal fator de virulência reconhecido de *S. epidermidis* parece ser um biofilme produzido para fornecer ao organismo proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (Moon *et al.*, 2001).

1.4.6 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis é uma bactéria do género *Enterococcus*. Como outras espécies do mesmo género, é uma bactéria gram-positiva, não formadora de esporos e anaeróbia facultativa. Pode crescer entre 10 °C e 45 °C, podendo surgir em alimentos através de contaminação fecal ou através de água contaminada, vegetação ou equipamento. Esta bactéria é extremamente resistente, conseguindo sobreviver em condições extremas de pH e concentrações elevadas de sal (Ray, 2004).

Esta bactéria é encontrada no trato intestinal do ser humano e animais de sangue quente, aves e insetos. Apesar de ser um organismo comensal, pode causar graves complicações, em particular em ambientes nosocomiais, uma vez que possui níveis de resistência elevados a antibióticos, o que contribui para a sua patogenicidade. Entre as complicações causadas por esta bactéria encontram-se a bacteremia, a endocardite, septicemia, meningite, entre outras infecções (Shankar *et al.*, 2002; Creti *et al.*, 2004).

1.4.7 *Escherichia coli*

Escherichia é um género da família Enterobacteriaceae e *Escherichia coli* é uma espécie desse género. A *E. coli* é uma bactéria gram-negativa, não formadora de esporos, mesófila, com o seu crescimento a efetuar-se desde os 7-10 °C até aos 50 °C, com um crescimento ótimo por volta dos 37 °C (Ray, 2004; Adams e Moss, 2008).

A *E. coli* é um habitante quase universal do intestino humano e de outros animais de sangue quente (Ray, 2004). Geralmente é um organismo comensal inofensivo. No entanto, pode ser um

patogénico oportunista, causando várias infeções como sepse por bactérias gram-negativas, infeções do trato urinário ou pneumonia em pacientes imunossuprimidos (Adams e Moss, 2008). A ocorrência desta bactéria é comum nas fezes, e as suas características de sobrevivência na água permitiram à bactéria *E. coli* ser um indicador de contaminação fecal e possível presença de patogénicos entéricos em água.

Existem quatro categorias principais de *E. coli* diarreicogénica baseadas nas propriedades virais distintas que se dividem em: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Adams e Moss, 2008).

A doença causada pela ETEC ocorre geralmente entre as 12h e as 36h após a ingestão do organismo. Os sintomas podem variar entre diarreia leve até uma severa síndrome de fezes aquosas sem sangue ou muco, dores de estômago e vômitos. Persiste geralmente por dois a três dias, embora em países em desenvolvimento seja uma causa comum de diarreia infantil, que pode provocar desidratação severa (Jay *et al.*, 2005; Adams e Moss, 2008).

A infeção por EIEC resulta em sintomas como febre, dores abdominais severas, mal-estar e por vezes diarreia aquosa que precede a passagem de fezes contendo sangue, muco e leucócitos fecais (Jay *et al.*, 2005; Adams e Moss, 2008).

A infeção por EPEC resulta em sintomas como mal-estar, vômitos e diarreia com fezes com muco. Estes sintomas surgem após 12 h a 36 h após a ingestão do organismo. Em crianças, a doença é mais severa e pode persistir por mais de duas semanas em alguns casos (Jay *et al.*, 2005; Adams e Moss, 2008).

A EHEC tem atraído mais atenções, não só porque a transmissão através de alimentos é mais comum do que as outras estirpes de *E. coli* diarreicogénica, como também porque a doença causada pela EHEC, que produz verotoxinas, pode variar desde uma diarreia não sanguinolenta, até uma colite hemorrágica, ou até a condições que podem pôr em risco a vida humana, como o síndrome urémico hemolítico (SHU) e púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) (Jay *et al.*, 2005; Adams e Moss, 2008).

1.4.8 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa que normalmente reside em solos e superfícies em ambientes aquosos (Gellatly e Hancock, 2013) e que pode infetar um variado número de hospedeiros animais e vegetais (Breidenstein *et al.*, 2011). Desde a sua descoberta em meados do século dezanove, conquistou um lugar notório na lista de patogénicos humanos. Tem múltiplos mecanismos de resistência e uma elevada adaptabilidade, permitindo uma rápida colonização em diversos ambientes. (Jimenez *et al.*, 2012). As infeções causadas por esta bactéria são muitas vezes nosocomiais e apresentam elevada mortalidade (Poole, 2011; Gellatly e Hancock, 2013). Comparativamente com outros agentes patogénicos, é extremamente difícil de erradicar, uma vez que apresenta uma alta resistência a uma ampla variedade de antibióticos, e devido à sua capacidade de se adaptar a condições ambientais diversas (Breidenstein *et al.*, 2011).

1.4.9 *Salmonella enterica*

Salmonella enterica é uma bactéria da família Enterobacteriaceae. São bactérias gram-negativas, não formadoras de esporos, e anaeróbicas facultativas. O seu crescimento situa-se a temperaturas acima dos 5°C e até 47°C com um ótimo crescimento aos 37 °C. A *Salmonella enterica* é sensível ao calor e rapidamente destruída por temperaturas de pasteurização (Adams e Moss, 2008).

Este microrganismo é principalmente habitante do trato gastrointestinal, e transportada por uma grande variedade de animais, como animais selvagens, roedores, animais domésticos, aves, répteis e insetos, que geralmente não apresentam sinais de contaminação. A *Salmonella enterica* pode ser disseminada através de fezes para o solo, água e alimentos e, por consequência, para os animais, incluindo o para o Homem (Adams e Moss, 2008; Jackson *et al.*, 2013). A transmissão é feita por via oral. Um período de exposição excessivo a temperaturas ótimas de crescimento da *Salmonella enterica* ou o tratamento ineficiente ou ausente de pasteurização são fatores comuns que contribuem para surtos desta bactéria. Os alimentos mais suscetíveis a esta bactéria são a carne, o leite e os ovos mal cozinhados. A contaminação pode ainda ser feita por contaminação cruzada (Adams e Moss, 2008). A *Salmonella enterica* é responsável por um número distinto de sintomas clínicos, que originam doença entérica ou doença sistémica (Grassl e Finlay, 2008).

As infeções gastrointestinais (doença entérica) são predominantemente associadas com os serotipos que ocorrem amplamente em animais e humanos. Podem variar em gravidade, desde transporte da infeção assintomático a diarreia severa (Adams e Moss, 2008). O período de incubação é tipicamente entre 6 e 48 horas, e os principais sintomas são febre, náusea e vômitos, dor abdominal e diarreia, que persistem entre alguns dias a mais de uma semana. A doença pode ser mais severa em grupos mais suscetíveis como crianças, idosos e indivíduos doentes (Adams e Moss, 2008).

A doença sistémica ocorre quando os serotipos se encontram adaptados ao hospedeiro, tornando-os mais invasivos e provocando a doença. A doença mais comum associada a este tipo de bactérias é a febre tifoide (Grassl e Finlay, 2008). Esta tem um período de incubação de entre aproximadamente 3 a 56 dias, sendo mais usual entre os 10 e os 20 dias após a ingestão da bactéria.

1.4.10 *Candida albicans*

Várias espécies de *Candida* são normalmente comensais inofensivas do trato gastrointestinal, sistema urinário e genitália. No entanto, podem também constituir um patogénico importante que causa diversas condições, incluindo infeções superficiais dolorosas, como a vaginite nas mulheres saudáveis, infeções severas na boca e esófago em indivíduos com vírus da imunodeficiência humana, e infeções na corrente sanguínea entre pacientes vulneráveis (Sudbery *et al.*, 2004). O espectro clínico de infeções por *Candida spp* varia entre a colonização benigna da pele e superfícies mucosas, às formas mucocutâneas de candidíase e infeções sistémicas (Netea *et al.*, 2008).

Candida albicans é uma levedura ubíqua que coloniza frequentemente a pele e superfícies mucosas dos indivíduos, sem causar qualquer doença. No entanto, quando os mecanismos normais de defesa do hospedeiro são comprometidos, *C. albicans* pode tornar-se um patogénico (Netea *et al.*,

2008). Nas superfícies mucosas, a limitação de nutrientes e a competição entre bactérias e fungos providencia pressões seletivas que resultam na eliminação de microrganismos menos adaptados (Calderone e Fonzi, 2001).

Uma característica fundamental desta espécie é a sua capacidade de crescer numa variedade de formas morfológicas, sendo organismos polimórficos. Um componente crucial da sua versatilidade é a sua habilidade de sobreviver como um comensal em diversos locais anatomicamente distintos. Esta capacidade significa que o espectro de doenças causadas por *C. albicans* e outras *Candida spp.* excede o da maioria dos outros microrganismos comensais (Calderone e Fonzi, 2001). Apesar de infeções causadas por outras espécies de *Candida* estarem a aumentar a sua prevalência, a maioria das candidíases é ainda causa pela *Candida albicans*. A candidaemia, a forma mais comum de candidíase invasiva, está associada a uma taxa de mortalidade superior a 30% em indivíduos que tenham os seus mecanismos de defesa comprometidos, como por exemplo em pacientes submetidos a quimioterapia, que recebam imunossupressores após transplante de órgãos ou ainda pacientes com o vírus VIH (Netea *et al.*, 2008).

1.5 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o potencial bioativo dos produtos da alfarrobeira do Algarve, averiguando o seu potencial de utilização tanto na indústria alimentar como na indústria cosmética, recorrendo ao estudo das suas propriedades antioxidantes, através de vários ensaios de determinação desta capacidade, e também ao estudo das suas capacidades antimicrobianas contra vários microrganismos. Para este propósito, o trabalho experimental foi estruturado em quatro diferentes etapas.

- 1) A primeira etapa consistiu na preparação de diferentes extratos (aquosos e hidroetanólicos) dos diferentes constituintes da vagem de alfarroba: grão, polpa e a vagem de alfarroba no seu todo, e na sua caracterização relativamente ao teor em compostos fenólicos totais e flavonoides totais.
- 2) A segunda etapa compreendeu a avaliação das propriedades antioxidantes dos extratos preparados, através de diversos métodos existentes para este fim: a capacidade de redução do ferro (FRAP), capacidade de redução do cobre (CUPRAC) e capacidade de sequestro dos radicais anião superóxido e 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*).
- 3) A terceira etapa consistiu na avaliação dos efeitos antimicrobianos dos extratos através de ensaios com bactérias gram-negativas e gram-positivas, e ainda com uma levedura.
- 4) Por último foi estudada a segurança dos extratos através da avaliação do seu potencial mutagénico, avaliado pelo teste de Ames.

2. Materiais e métodos

2.1 Reagentes e meios de cultura

Na realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e meios de cultura: acetato de amônio (Fisher Scientific, 99,6%); acetato de sódio trihidratado (Panreac, 99%); ácido acético (Riedel-de Haen, 99,5%); ácido ascórbico (Fisher Chemical); ácido cítrico (Panreac Applichem, 99,5%); ácido gálico (Merck, 99,5%); ácido clorídrico (Panreac); azul de nitrotetrazólio (NBT²⁺) (Sigma, 90%); Bacto agar (Quiloban); Biotina (Sigma); Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (Biokar diagnostics), carbonato de sódio (Applichem Panreac, 99,5%); catequina monohidratada (Sigma-aldrich, 96%); cloreto de alumínio hexahidratado (Panreac); cloreto de cobre (II) bihidratado (Riedel-de Haen, 99%); cloreto de ferro hexahidratado (José Manuel Gomes dos Santos, LDA, 99%); cloreto de sódio (Panreac, 99%); Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma); 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) (Fulka); dihidrogenofosfato de sódio hidratado (NaH₂PO₄·2H₂O) (Panreac Applichem); dinucléotido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) (Amresco); etanol (Sigma-Aldrich, 99,8%); fosfato de potássio dibásico (Honeywell, 98%); fosfato de potássio monobásico (Sigma-aldrich, 99%); Glucose monohidratada (Fluka analytical, 99%); hidrogenofosfato de amônio e sódio tetrahidratado (NaNH₄HPO₄·4H₂O) (Sigma-Aldrich, 99%); hidróxido de sódio (Eka); histidina.HCl (Merck); metassulfato de fenazina (PMS) (Sigma-Aldrich, 98%); Mueller-Hinton Agar (MHA) (Biokar diagnostics); Mueller-Hinton Broth; (MHB) (Biokar diagnostics); neocuproína (Sigma-Aldrich); nitrito de sódio (Merck, 99%); Nutrient broth nº 2 (Oxoid); reagente de Folin (Merck); Reinforced Clostridial Medium (Oxoid), sulfato de ferro heptahidratado (Panreac); sulfato de magnésio heptahidratado (LABCHEM); *tert*-butil-hidroperóxido (t-BHP) (Aldrich); 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Fluka, 99%); Triptona-Soja-Agar Agar (TSA) (Biokar diagnostics). Na preparação de todas as soluções e meios de cultura utilizou-se água ultra-pura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

2.2. Preparação dos extratos de alfarroba

As vagens de alfarroba secas estudadas foram colhidas na região de Tavira, no Algarve, tendo sido secas em ambiente fresco e seco e no escuro durante três meses. Primeiramente as vagens foram devidamente lavadas e secas para retirar resíduos de pó, terra e outras possíveis contaminações e pesadas numa balança eletrónica. De seguida, as vagens foram separadas nos seus diferentes componentes, tendo-se procedido à pesagem das diferentes frações (grão e polpa). Os grãos e a polpa foram moídos até serem reduzidos a um pó o mais fino possível com auxílio de um Robot de cozinha (Bimby Vorwerk TM31). As amostras foram guardadas em recipientes de plástico, congeladas e protegidas da luz até ao momento de utilização, de modo a minimizar a oxidação dos vários constituintes, mantendo as propriedades iniciais da alfarroba.

Foram preparados extratos de grão, de polpa e misto contendo grão e polpa em proporções adequadas (aproximadamente 11% e grão e 89% de polpa). Para a polpa foram preparados dois

extratos com solventes diferentes: água e etanol 70% (v/v). Os extratos de grão e misto foram apenas preparados em etanol 70% (v/v).

Para a realização do extrato aquoso foram colocados 20 g de amostra em copos fechados com 200 mL de água miliQ, que permaneceram em agitação numa placa de agitação magnética (FALC Instruments), em banho maria, durante 15 minutos após a fervura da água. Os extratos foram realizados em duplicado. De seguida, foi realizada uma filtração a vácuo, tendo o resíduo obtido sido lavado por duas vezes com 60 mL de água miliQ. O extrato resultante foi congelado e liofilizado de forma a remover toda a água. O extrato seco foi pesado, aliqotado e congelado para posterior utilização.

Os extratos em etanol 70% (v/v) foram realizados em condições semelhantes para as amostras de grão, polpa e mistas. Foram colocados 20 g de amostra em copos fechados com 200 mL de etanol 70%, que permaneceram em agitação durante 24 h numa placa de agitação magnética (ASINCRO P Selecta), protegidos da luz, sem aquecimento. Os três extratos foram realizados em duplicado. De seguida, foi realizada uma filtração a vácuo a todos os extratos, com duas lavagens de 60 mL de etanol 70%. O etanol foi posteriormente evaporado em rotavapor (BÜCHI R-200, Suíça) em banho a 45 °C – 50 °C (BÜCHI B490, Suíça), tendo a água remanescente sido retirada por liofilização. Os extratos secos foram então pesados, aliqotados e congelados para posterior utilização.

Para efetuar todos os ensaios, os extratos de polpa (aquoso e etanólico) e misto foram sempre reconstituídos em água enquanto que o extrato de grão foi sempre reconstituído em etanol 70%, exceto na realização do teste de Ames em que foi reconstituído em DMSO.

2.3. Quantificação do teor em fenóis totais

A determinação da composição em constituintes fenólicos dos extratos de alfarroba foi realizada segundo o método de Folin-Ciocalteu. Os compostos fenólicos, a um pH alcalino, encontram-se na forma de ião fenolato e reduzem o heteropolianião molibdotungnosteniofosfórico do reagente de Folin-Ciocalteu, o que origina o aparecimento de um produto corado de cor azul, com o seu máximo de absorção nos 765 nm (Singleton *et al.*, 1999; Blainski *et al.*, 2013). A intensidade da coloração desenvolvida será proporcional ao teor em compostos fenólicos nas amostras.

Para a determinação dos compostos fenólicos totais utilizou-se o método descrito por Kosar *et al.* (2008). Em tubos de ensaio contendo 3 mL de água, adicionaram-se 50 µL de amostra com uma concentração adequada, de modo a que os valores de absorvância se encontrassem dentro da reta de calibração, e 250 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após permanecer a temperatura ambiente durante 1 minuto, foi adicionado 750 µL de carbonato de sódio, Na₂CO₃, 20% (p/v), e perfez-se a um volume de 5 mL com água miliQ. Após um período de incubação de 2 horas no escuro e a temperatura ambiente, as amostras foram lidas num espectrofotómetro (Pharmacia LKB Novaspec II) a 765 nm, contra um branco preparado de forma semelhante, porém utilizando 50 µL de água miliQ em vez de amostra.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada de forma igual às amostras, mas

substituindo estas por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 50 e os 500 mg/L. Os resultados foram expressos em microgramas de equivalentes de ácido gálico por miligrama de extrato seco.

2.4. Quantificação de Flavonoides Totais

A determinação de flavonoides totais foi realizada segundo o método de complexação com o alumínio na presença de nitrito e em meio alcalino, de acordo com o método descrito por Barros *et al.* (2010). Nestas condições os flavonoides complexam com o alumínio, originando um complexo de coloração rosada, com um máximo de absorção a 510 nm, sendo a concentração de flavonoides proporcional à intensidade cor rosada formada (Pekal e Pyrzynska, 2014).

Em tubos de ensaio foram adicionados 2 mL de água miliQ, 250 µL de amostra diluída de modo a que os valores se encontrassem dentro da curva de calibração para as amostras de polpa etanólico, polpa aquoso e misto etanólico, ou 50 µL no caso da amostra de grão etanólico e 150 µL de NaNO₂, 5%(p/v). A mistura foi agitada num vortex (VWR Mixer Mini Vortex, USA). Após 6 minutos de repouso à temperatura ambiente, adicionaram-se 150 µL de AlCl₃, 10% (p/v). Após agitar no vortex (VWR Mixer Mini Vortex, USA) e após outros 6 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 2 mL de NaOH, 4% (p/v) e fez-se o volume a 5 mL com água miliQ. A mistura foi então agitada novamente no vortex (VWR Mixer Mini Vortex, USA) e incubada 15 minutos em ambiente escuro, à temperatura ambiente. Após o período de incubação, a intensidade da cor rosada foi medida a um comprimento de onda de 510 nm (Pharmacia LKB Novaspec II), usando como branco água miliQ.

Foi realizada uma curva de calibração de catequina, preparada de forma semelhante às amostras, com diferentes concentrações de catequina (entre 1 mM e 0,001565 mM), utilizada para o cálculo da concentração de flavonoides nas diferentes amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicado, e os resultados apresentados em micromoles equivalente de catequina por grama de extrato seco.

2.5. Determinação da atividade antioxidante

2.5.1. Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH[•]

O radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) tem uma cor púrpura apresentando o seu máximo de absorção a um comprimento de onda de 517 nm. Ao aceitar um átomo de hidrogénio de um antioxidante, ou ao ser reduzido, o radical vai desaparecendo, dando lugar à hidrazina correspondente (figura 2.1), passando a cor de púrpura para amarelo (Magalhães *et al.*, 2008; Moon e Shibamoto, 2009). Assim, a intensidade da cor amarelo determina a atividade antioxidante, havendo uma relação proporcional entre os dois parâmetros (Prior *et al.*, 2005).

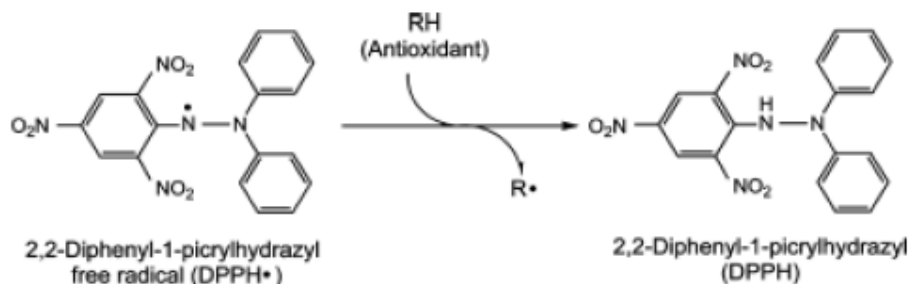


Figura 2.1 – Reação de desativação do radical DPPH• (adaptado de Moon e Shibamoto, 2009).

Este ensaio foi efetuado de acordo com o método descrito por Miceli *et al.* (2009). Os extratos secos foram reconstituídos como indicado no ponto 2.2 tendo, de seguida, sido preparadas diferentes diluições de cada um. Seguidamente, em tubos de ensaio, foram adicionados 500 µL de cada uma dessas diluições, de modo a se conseguir obter uma curva para cada uma das amostras, com 3 mL da solução DPPH• (24mg/L em etanol). Foi realizado um controlo da mesma forma que as amostras, substituindo esta por igual volume de água miliQ (no caso dos extratos de polpa e misto) ou de etanol 70% (no caso do extrato de grão). Os tubos foram agitados no vortex (VWR Mixer Mini Vortex, USA) e incubados no escuro à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Após o período de incubação, as absorvâncias foram lidas numa cuvete de vidro, a um comprimento de onda de 517 nm (espectrofotómetro Pharmacia LKB Novaspec II).

Foi realizada uma curva de calibração com ácido ascórbico de forma semelhante às amostras, mas utilizando padrões com concentrações de ácido ascórbico entre 0,0044 e 0,035 mg/mL.

A percentagem de inibição foi calculada através da equação (1):

$$\% \text{ Inibição} = \frac{Abs_{branco} - Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Todos os ensaios foram realizados em triplicado, e os resultados expressos em IC₅₀, que corresponde à quantidade de extrato responsável por 50% de inibição da descoloração do radical DPPH•, e ainda µg de equivalentes de ácido ascórbico por mg de extrato seco.

2.5.2. Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP

O ensaio de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) mede a capacidade dos antioxidantes para reduzir o complexo Fe(III)- tripiriditriazina (Fe³⁺-TPTZ) a um complexo ferroso de coloração azul intensa Fe(II)-tripiriditriazina (Fe²⁺-TPTZ) (figura 2.2), em meio ácido (Magalhães *et al.*, 2008). O poder de redução está relacionado com o grau de hidroxilação e extensão da conjugação em polifenóis (Prior *et al.*, 2005). A intensidade da coloração azul pode ser quantificada espectralmente a um

comprimento de onda de 593 nm, e está linearmente relacionada com a atividade antioxidante (Ramful *et al.*, 2010).

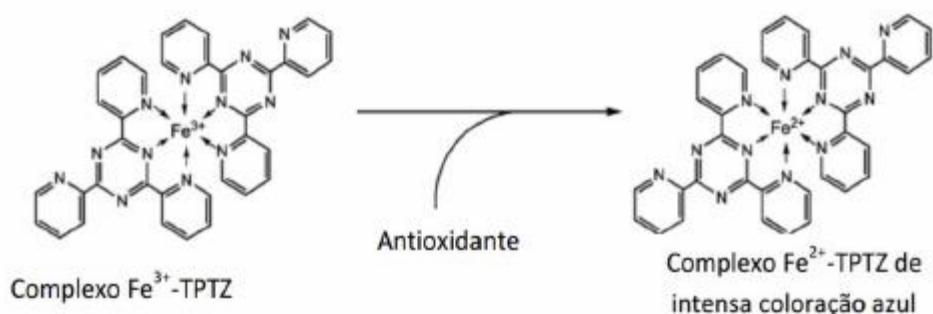


Figura 2.2 – Reação de formação do complexo Fe^{2+} -TPTZ após redução de Fe^{3+} devido à ação de um antioxidante (adaptado de Prior *et al.*, 2005).

O procedimento foi realizado segundo o método descrito por Ramful *et al.* (2010). Assim, em tubos de ensaio adicionaram-se 3 mL de reagente de FRAP previamente preparado e 300 μL de água miliQ. O reagente FRAP preparou-se no momento da utilização, adicionando 25 mL de tampão acetato 0,25 M (pH 3,6), 2,5 mL de TPTZ (10 mM, em HCl 40 mM) e 2,5 mL de cloreto de ferro (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM). O ensaio iniciou-se com a adição, num tubo de ensaio, de 3,0 mL do reagente FRAP, preparado de fresco e pré-aquecido a 37 °C, com 300 μL de água e 100 μL de cada uma das amostras. As misturas foram incubadas no escuro durante 20 minutos a 37 °C. Durante esta incubação foi possível observar o aparecimento de uma coloração azul, cuja intensidade variava entre as várias amostras, e que foi quantificada por leitura da absorvância a 593 nm num espectrofotômetro (Pharmacia LKB Novaspec II) utilizando como branco a absorvância do reagente FRAP.

As amostras foram analisadas em triplicado, tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita para as amostras, mas substituindo as amostras por soluções de sulfato ferroso com concentrações entre os 0 e os 1,25 mM. Os resultados foram expressos em μmol de Fe^{2+} por grama de peso seco de extrato.

2.5.3 Determinação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC

O ensaio de CUPRAC (*Copper Reduction Assay*) é baseado na redução do cobre Cu(II) a Cu(I), por uma ação combinada de todos os antioxidantes (agentes redutores) presentes na amostra (Prior *et al.*, 2005). O CUPRAC utiliza um composto, a neocuproína, que complexa com o cobre. A forma reduzida deste complexo, Cu(I)-neocuproína, apresenta uma coloração intensa com o seu máximo de absorção a um comprimento de onda de 450 nm. Assim, a redução da forma oxidada deste complexo (Cu(II)-neocuproína) pela ação dos polifenóis presentes na amostra (figura 2.3) pode ser espectrofotometricamente determinada através da leitura da absorvância a 450 nm (Apak *et al.*, 2004).

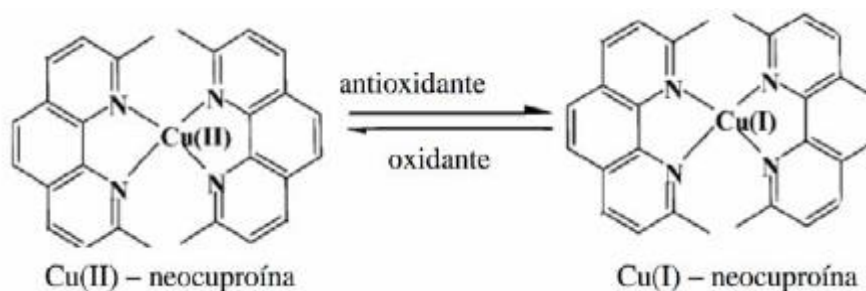


Figura 2.3 – Redução do complexo Cu(II)-neocuproína a Cu(I)-neocuproína, por ação dos antioxidantes da amostra (adaptado de Apak et al., 2004).

Este ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Apak *et al.* (2004). Assim, em tubos de ensaio adicionou-se 1 mL de uma solução de cloreto de cobre (II) bihidratado 10 mM, 1 mL de solução de acetato de amônio 1 M, 1 mL de solução de neocuproína 7,5 mM em etanol 99%. De seguida, adicionaram-se 100 µL das amostras previamente diluídas e 1 mL de água miliQ. Efetuou-se um branco da mesma forma que as amostras, mas substituindo-as por 1,1 mL de água miliQ. Procedeu-se a um período de incubação dos tubos de 1 hora à temperatura ambiente e, após esse período, foram medidas as absorvâncias a um comprimento de onda de 450 nm espectrofotómetro (Pharmacia LKB Novaspec II).

Foi realizada uma curva de calibração com ácido ascórbico procedendo da mesma forma que para as amostras, utilizando 1,1 mL de padrões com diferentes concentrações, entre os 0 e os 250 µM. Todos os ensaios foram realizados em triplicado, e os resultados expressos em µmol de equivalentes de ácido ascórbico por grama de extrato seco.

2.5.4. Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido

O azul de nitrotetrazólio (NBT^{2+}) reage com o radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) originando um composto chamado azul formazano (figura 2.4). A formação do formazano é acompanhada pelo aparecimento de uma coloração púrpura, que apresenta o seu máximo de absorção a 560 nm (Valentão *et al.*, 2001; Gülçin, 2006; Magalhães *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2010). Assim, se se adicionar à mistura de reação um composto com capacidade para captar o $\text{O}_2^{\cdot-}$, passarão a existir no meio reacional dois compostos em competição pelo radical anião superóxido, traduzindo-se essa competição numa diminuição da extensão da redução do NBT^{2+} , com uma consequente diminuição da taxa de aumento da absorvância a um comprimento de onda de 560 nm (Magalhães *et al.*, 2008).

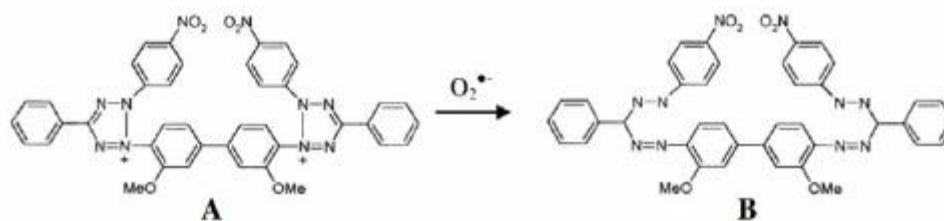


Figura 2.4 – Redução do NBT^{2+} (A) pelo radical anião superóxido, originando azul de formazano (B).

O radical anião superóxido pode ser produzido em condições aeróbias, recorrendo ao sistema metossulfato de fenazina (PMS)/NADH em que o PMS, após ser reduzido pelo NADH, irá reagir com o oxigénio, dando origem ao radical anião superóxido (figura 2.5) (Nakamura *et al.*, 1992). Uma vez que o radical anião superóxido resulta da redução do oxigénio molecular, podendo surgir no decurso de vários processos metabólicos, este ensaio possui a vantagem de utilizar um oxidante com grande relevância fisiológica, contrariamente aos restantes ensaios efetuados (Magalhães *et al.*, 2008).

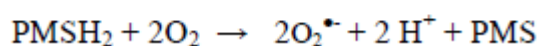
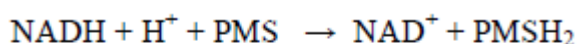


Figura 2.5 – Reações de formação do radical anião superóxido através do sistema PMS/NADH (adaptado de Nakamura *et al.*, 1992).

A capacidade das amostras para sequestrar o radical anião superóxido foi avaliada com base no método descrito por Valentão *et al.* (2001), com pequenas alterações. Em cuvetes de espectrofotómetro, adicionaram-se 200 μL de amostra em diferentes diluições, 300 μL de NADH (1,66 mM em tampão fosfato 19 mM, pH 7,4), 300 μL de NBT^{2+} (430 μM em tampão fosfato 19 mM, pH 7,4) e tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) de modo a completar um volume de 2950 μL . A mistura foi agitada e, de seguida, de modo a iniciar a reação, adicionaram-se 50 μL de PMS (162 μM em tampão fosfato 19 mM, pH 7,4). A absorvância foi por fim medida de 10 em 10 segundos, durante 2 minutos à temperatura ambiente num espectrofotómetro (Pharmacia LKB NovaSpec II) a um comprimento de onda de 560 nm. Realizou-se igualmente um ensaio controlo, substituindo a amostra por igual volume de solvente da amostra.

Todas as determinações foram realizadas em triplicado, tendo a percentagem de inibição da formação do azul de formazano sido avaliada através da equação (2).

$$\% \text{ inibição} = \frac{Abs_{branco} - Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Os resultados foram apresentados em valores de IC50 para cada extrato, que corresponde à concentração responsável por 50% da inibição do azul de formazano.

2.6. Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi estudada testando a sensibilidade aos extratos de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC1228, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) ATCC33591, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Listeria monocytogenes* ATCC15313, *Bacillus cereus* ATCC11778 e *Propionibacterium acnes* ATCC6919), bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis ATCC10708), e uma levedura (*Candida albicans* ATCC10231).

Todos os ensaios e procedimentos foram realizados em condições de assepsia (câmara de fluxo laminar Steril - VBH). Todos os microrganismos foram mantidos a -70 °C em meio de cultura contendo glicerol (15% v/v). Para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana, os microrganismos foram inoculados em placas de Petri contendo meio TSA, exceto a *L. monocytogenes* que cresceu em BHIA, a *C. albicans* que cresceu em MHA e o *P. acnes* que cresceu em meio Reinforced Clostridial Medium. As placas foram incubadas durante 24 ou 48 horas (*C. albicans* e *P. acnes*), em estufa a 37 °C ou 30 °C (*B. cereus* e *C. albicans*). No caso do *P. acnes* a cultura foi efetuada em atmosfera anaeróbia (Biomérieux).

A suspensão inicial para a realização dos ensaios foi preparada a partir destas placas, transferindo-se, com o auxílio de uma ansa, colônias para um tubo contendo 3,0 mL de meio salino (0,85 % NaCl). A turbidez da suspensão de microrganismos foi ajustada a cerca de 0,5 na escala de McFarland (Densímetro Grant-Bio DEN-1B), o que corresponde a uma densidade celular de 1x10⁸ UFC/mL, no caso das bactérias ou 1x10⁶ UFC/mL no caso da levedura.

A atividade antimicrobiana dos diferentes extratos foi avaliada através de duas técnicas: O ensaio de difusão em placa e o ensaio pelo método de microdiluição em meio líquido, tendo todos os ensaios sido realizados em duplicado.

2.6.1. Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em agar

O método de difusão em agar baseia-se no Método de Kirby-Bauer (1966). Este método baseia-se na avaliação da concentração de substância necessária para inibir uma determinada estirpe bacteriana, que se determina através da medição do halo de inibição de crescimento criado na superfície de uma placa de agar com um meio de cultura adequado, e inoculada homogêaneamente com a bactéria em estudo. São depositados na placa discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro

que são embebidos com uma certa quantidade da substância em estudo, ou são efetuados poços no meio a distâncias equivalentes, que são preenchidos com um determinado volume de amostra (Hacek *et al.*, 1999; Mbata *et al.*, 2006). Uma vez aplicadas as amostras nas placas, estas devem ser colocadas em refrigeração a 4 °C, permitindo assim a difusão total do extrato antes de se proceder à incubação da bactéria em estufa (Tepe *et al.*, 2004). A dimensão do halo criado pode ser afetada por fatores como a capacidade de difusão do composto, a quantidade e concentração do composto e ainda o tempo de incubação.

As suspensões preparadas como anteriormente descrito foram aplicadas com o auxílio de uma zaragatoa na superfície de placas de *Petri* de plástico com meio MHA, ou Reinforced Clostridial Medium (*P. acnes*). Posteriormente, foram efetuados poços equidistantes, de aproximadamente 6 mm de diâmetro, nas diversas placas. Os poços foram então preenchidos com 45 µL dos extratos de polpa etanólico, polpa aquoso, misto etanólico e grão etanólico, em diferentes concentrações (concentrações entre 0 e 500 mg/mL para as amostras de polpa e mista e concentrações entre 0 e 25 mg/mL para as amostras de grão). Seguidamente, as placas foram colocadas em refrigeração a 4 °C, de modo a haver a difusão total dos extratos e, por fim, foram incubadas em estufa (Memmert) a 37 °C (ou a 30 °C, para a bactéria *Bacillus cereus* e levedura *Candida albicans*) durante 24 horas. No caso da bactéria *P. acnes* a incubação foi efetuada em atmosfera anaeróbia (Biomeriëux). Foram igualmente realizados ensaios controlo utilizando 45 µL dos solventes das amostras (água ou etanol 70 %). Após o tempo de incubação em estufa, os diâmetros das zonas de inibição criadas foram medidos com recurso a uma régua, e a atividade antimicrobiana foi estimada a partir desses mesmos diâmetros.

2.6.2. Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em meio líquido

Existem vários métodos disponíveis para a realização de testes antibacterianos e antifúngicos, e para a determinação das concentrações mínimas inibitórias (MICs) de vários agentes (Zgoda e Porter, 2001). Nos ensaios pelo método de difusão em agar a capacidade de difusão do componente antimicrobiano pode influenciar os resultados obtidos. Esta técnica também não distingue efeitos bactericidas e bacteriostáticos, e não é possível a determinação da concentração mínima inibitória (MIC). O método de microdiluição baseia-se no método desenvolvido por Eloff (1998). Nesta técnica as microplacas de 96 poços são utilizadas para analisar os extratos de um modo mais sensível, realizando várias diluições em série. Este método é um método relativamente barato, é reprodutível, sensível, tendo ainda a vantagem de necessitar de uma quantidade de amostra menor, quando comparado com o método de difusão em agar (Ostrosky *et al.*, 2008).

Em microplacas de 96 poços (Grainer), adicionaram-se 100 µL de meio MHB a todos os poços. Em seguida adicionaram-se 100 µL do extrato a analisar, numa concentração inicial de 12,5 mg/mL, na coluna 1, tendo de seguida sido efetuadas diluições sequenciais de 1:2, tendo-se desprezado 100 µL da última coluna de modo que todos os poços ficassem com o mesmo volume. Por fim, adicionaram-se 10 µL das suspensões microbianas preparadas como anteriormente descrito. Foram efetuados

ensaios em que se substituíram os extratos por igual volume do solvente dos extratos (controle negativo) e ensaios sem adição dos microrganismos (controle de esterilidade).

As microplacas foram então incubadas a 30 °C (*B. cereus*) ou 37 °C (restantes microrganismos), por um período de 24 horas, ao abrigo da luz e no caso da *P. acnes* em condições anaeróbias. Os resultados foram analisados observando a turvação dos poços, seguindo-se de uma repicagem para placas com meio MHA. A concentração mínima inibitória foi considerada como a menor concentração de extrato capaz de inibir o crescimento microbiano.

2.7. Avaliação da atividade mutagénica através do Teste de Ames

O teste de Ames ou *bacterial reverse mutagenicity test*, desenvolvido por Bruce Ames em 1975, deteta o potencial mutagénico de substâncias através da indução da mutação reversa no operão histidina em mutantes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium LT2. Este teste é amplamente utilizado para a determinação da mutagenicidade de compostos puros ou misturas, como por exemplo extratos obtidos a partir de certos alimentos (Maron e Ames, 1983; Pan *et al.*, 2010).

O teste de Ames utiliza estirpes com diversas mutações em genes do operão histidina, e que, portanto, não têm a capacidade de sintetizar este aminoácido. Ao crescerem num meio de cultura sem histidina (um meio que contém apenas sais minerais e uma fonte de carbono e azoto), apenas uma percentagem reduzida de células tem a capacidade de reverter espontaneamente a mutação, sintetizando a histidina e conseguindo então crescer, formando colónias. Uma exposição destas estirpes a um agente mutagénico leva a um aumento da taxa de reversão da mutação, havendo, por consequência, um aumento do número de colónias capazes de sintetizar a histidina. Assim, existe uma relação diretamente proporcional entre o número de revertentes e a dose de mutagénico adicionado (Mortelmans e Zeiger, 2000).

Os resultados são expressos em número de revertentes por placa, ou número de revertentes por quantidade de substância testada (Mortemans e Zeiger, 2000). Um determinado composto é positivo no teste de Ames quando se observa um efeito dose-resposta, existindo um aumento do número de revertentes com o aumento da concentração e, do mesmo modo, quando se observa uma duplicação do número de revertentes espontâneos para uma das doses estudadas. A atividade mutagénica pode ser calculada através do declive da parte linear da curva de dose-resposta.

2.7.1. Caracterização das estirpes utilizadas

Neste estudo, utilizaram-se duas estirpes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium: A estirpe TA100 e a estirpe TA102. A estirpe TA100 contém uma mutação por substituição de bases, em que o códon CTC foi substituído por CCC no alelo *hisG46* (Mortelmans e Zeiger, 2000). Para além desta mutação no operão da histidina, a estirpe TA100 possui outras características adicionais que aumentam a sua sensibilidade para a deteção de mutagénicos. Estas incluem a mutação *rfa*, que causa a perda parcial da barreira lipopolissacárida aumentando a permeabilidade da parede celular bacteriana a moléculas de grande dimensão (Ames e Durston, 1973);

A deleção *uvrB*, que corresponde a uma deleção do gene que codifica para uma das enzimas envolvidas no sistema de reparação de DNA por excisão e que, ao abranger parte do gene que codifica para a biotina, torna a estirpe incapaz de crescer na sua ausência (Ames e Durston, 1973); e a inserção do plasmídeo pKM101, que confere resistência à ampicilina, e que contém os genes de um sistema de reparação errônea, o que permite aumentar a frequência da mutação. Esta estirpe exibe um número de revertentes espontâneos entre os 150 e os 200 (Maron e Ames, 1983; Mortelmans e Zeiger, 2000).

Na estirpe TA102, e com o objetivo de ampliar o número de alvos por célula, o gene da histidina foi removido do cromossoma bacteriano encontrando-se o gene mutante (*hisG428*) no plasmídeo pAQ1, que confere resistência à tetraciclina. Para além desta mutação, esta estirpe possui ainda a mutação *rfa* e o plasmídeo pKM101. O gene mutante contém uma mutação *ochre*, TAA, que pode ser revertida por todas as possíveis modificações de pares de bases, levando a transições ou transversões. A estirpe TA102 difere das outras estirpes padrão utilizadas nos testes de Ames, pelo facto de possuir um par de base T:A (timina: adenina) no local de reversão, ao passo que todas as outras estirpes, possuem, neste local, o par de bases G:C (guanina-citosina). É provável que esta diferença seja responsável pela sensibilidade única da TA102 à reversão mediada por mutagêneos do tipo oxidativo (Levin *et al.*, 1984; Mortelmans e Zeiger, 2000). Esta estirpe apresenta um número de revertentes espontâneos entre os 100 e os 300 (Mortelmans e Zeiger, 2000).

2.7.2 Realização experimental do Teste de Ames

As estirpes para a realização dos ensaios foram inoculadas, a partir de *stocks* de glicerol congelados a - 70 °C, em meio NB nº2 e incubadas durante 12 a 16 horas, a 37 °C, ao abrigo da luz e com agitação (210 rpm) numa incubadora orbital (Innova 4000 New Brunswick Scientific).

O teste de Ames foi realizado na variante de *Plate assay* de acordo com o procedimento descrito por Mortelmans e Zeiger (2000). Assim, em tubos de top agar (tabela 2.1) adicionaram-se volumes entre 0 e 50 µL dos extratos analisados, com 500 µL de tampão fosfato de sódio e 100 µL de cultura bacteriana. Para o volume final se manter constante, este foi sempre ajustado com água estéril ou DMSO (no extrato de grão) até um volume final de 650 µL. A mistura foi então agitada num vortex (VWR Mixer Mini Vortex, USA) e colocada em placas de *Petri* com meio VB (tabela 2.2). As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas. Posteriormente, procedeu-se à contagem manual das colónias de revertentes para cada concentração de cada extrato. os ensaios foram todos realizados em triplicado.

Tabela 2.1 - Composição do top agar por litro (Maron e Ames, 1983).

Reagentes	Quantidade / Concentração
Agar	6 g
NaCl	5 g
Histidina	0,05 mM
Biotina	0,05 mM

A histidina e a biotina foram adicionadas após esterilização da mistura de NaCl e agar, a partir de uma solução estéril e equimolar de histidina e biotina (0,5 mM). Após esta suplementação o meio foi imediatamente distribuído, em alíquotas de 2 mL, por tubos de vidro esterilizados.

Tabela 2.2- Composição do meio VB (por litro) (Maron e Ames, 1983).

Reagentes	Quantidade (g)
Glucose	20
Agar	15
K ₂ HPO ₄	10
NaH ₂ NH ₄ PO ₄ .4H ₂ O	3,5
Ácido cítrico monoidratado	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2

O meio VB resulta da mistura, após esterilização, de soluções de agar (1,5%), glucose (40%p/v) e de uma solução de sais composta por MgSO₄.7H₂O (10g/L), ácido cítrico monoidratado (100g/L), K₂HPO₄ (500g/L) e NaH₂NH₄PO₄.4H₂O (175g/L).

2.8. Análise Estatística

De forma a determinar se existiam diferenças significativas entre os vários parâmetros analisados nos diferentes extratos realizou-se a análise paramétrica One-Way ANOVA, seguida de Teste Tukey. Para tal foram previamente testados os pressupostos da análise, isto é, a normalidade dos resíduos e a homogeneidade de variâncias (Teste de Cochran, Hartley e Bartlett). O nível de significância para a análise estatística efetuada foi de 0,05, tendo sido utilizado o software STATISTICA™ 7.0 (StatSoft) no tratamento dos dados.

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação dos fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu

Os resultados referentes à quantificação dos compostos fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteu nos diferentes extratos de alfarroba encontram-se representados na figura 3.1.

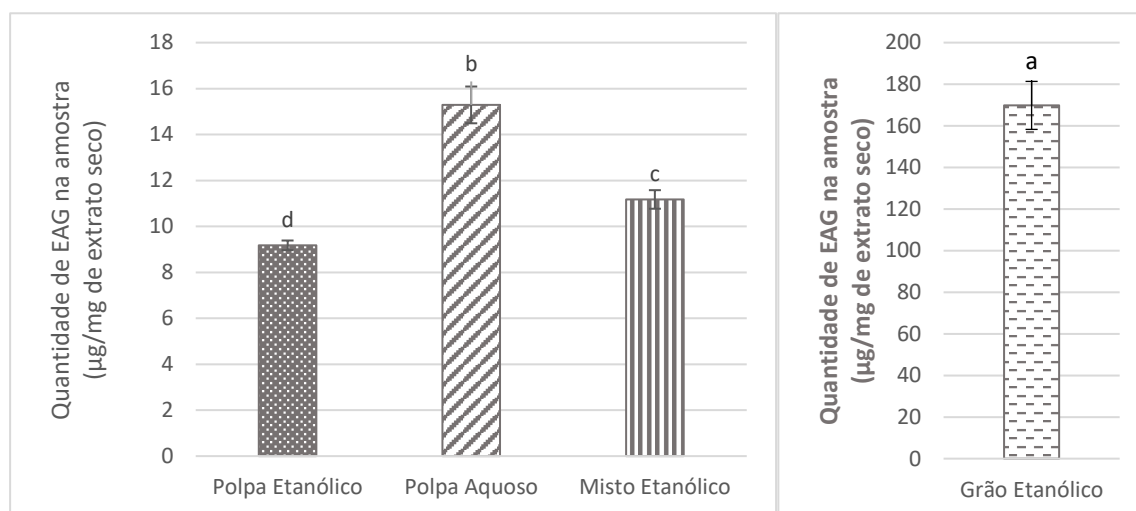


Figura 3.1 – Teor de compostos fenólicos totais nas diferentes amostras testadas. Amostras com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos (figura 3.1) mostram a existência de uma variação muito significativa no teor de compostos fenólicos entre os diferentes extratos, principalmente entre o extrato etanólico de grão e os restantes extratos, com este a possuir um valor cerca de 10 vezes superior aos restantes. Os valores variaram entre os 9,18 e os 169,82 µg de equivalentes de ácido gálico por mg de extrato seco. O extrato etanólico de grão foi o que apresentou o valor de compostos fenólicos mais elevado, por oposição ao extrato etanólico de polpa que foi o que apresentou o menor valor, sendo todos os valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). As diferenças observadas entre o teor em compostos fenólicos dos extratos aquoso e etanólico da polpa sugerem que o método de extração com água quente seja mais eficiente a extrair os compostos fenólicos da polpa do que a extração com etanol (70% v/v) à temperatura ambiente.

Num estudo realizado por Benkovic *et al.* (2017), onde foram igualmente estudadas as propriedades da alfarroba, os resultados obtidos para compostos fenólicos totais de extratos em acetona (70%) de farinha de alfarroba contendo as suas sementes foram de 15,74 mg, 9,80 mg e 4,51 mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato, sendo que estas variações advêm de amostras com tamanhos de partículas distintos e técnicas de moagem das partículas também distintas. Para amostras de farinha de alfarroba não contendo as suas sementes, os valores situaram-se nos 17,96, 16,76 e 15,58 mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. Com base nestes resultados, os autores concluíram que a semente seria a parte da vagem com menor teor em compostos fenólicos.

Custódio *et al.* (2015) estudaram extratos aquosos de polpa e de gérmen tendo obtido valores de 8,2 mg e de 6,1 mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco de polpa e de gérmen, respetivamente. Por sua vez, Durazzo *et al.* (2014), avaliaram o teor em polifenóis de extratos, obtidos por extração sequencial com metanol/água (50:50 v/v, pH 2) e acetona/água (70:30 v/v), de farinhas de diferentes partes da semente de alfarroba (goma, gérmen e semente inteira), obtendo valores de 0,7103 mg equivalentes de ácido gálico por grama de goma, 24,29 mg equivalentes de ácido gálico por grama de farinha preparada com o grão inteiro e 19,26 mg equivalentes de ácido gálico por grama de farinha de gérmen de alfarroba. Dudonné *et al.* (2009) avaliaram o teor em compostos fenólicos totais de um extrato aquoso da vagem da alfarroba (extrato misto) tendo obtido um valor de 23,58 mg de equivalentes ácido gálico por grama de extrato.

Comparando os valores encontrados na literatura com os obtidos experimentalmente é possível observar a existência de algumas diferenças respeitantes ao conteúdo em fenóis totais. Respetivamente às amostras de polpa e misto, os valores obtidos foram semelhantes aos reportados por Custódio *et al.* (2015) e por Benkovic *et al.* (2017), mas inferiores ao reportado por Dudonné *et al.* (2009). Também o extrato de grão apresentou valores bastante superiores às restantes amostras o que contradiz os resultados de Benkovic *et al.* (2017). As diferenças verificadas poderão relacionar-se com diversos fatores como a dimensão da partícula e o tipo de moagem (Durazzo *et al.* 2014; Benkovic *et al.*, 2017), a proveniência da alfarrobeira, o estado de maturação (Ritbi *et al.*, 2016a, 2017) e a percentagem de humidade do fruto, bem como com as diferenças de metodologia na preparação dos extratos, nomeadamente no que diz respeito ao solvente utilizado e ao tempo e temperatura de extração. Apesar dos valores não poderem ser diretamente comparáveis, por estarem expressos por peso de farinha e não por peso de extrato, os resultados de Durazzo *et al.* (2014) também demonstram a existência de uma quantidade muito significativa de compostos fenólicos totais na farinha preparada com o grão inteiro.

3.2. Quantificação dos Flavonoides Totais

Os resultados relativos à quantificação de flavonoides totais nos diferentes extratos de alfarroba pelo método de complexação com o alumínio na presença de nitrito encontram-se representados na figura 3.2.

Através da análise dos resultados obtidos, é verificável uma diferença significativa do teor em flavonoides totais entre os diferentes extratos estudados. Os valores variaram entre os 5,58 e os 70,36 μmol de equivalentes de catequina por g de extrato seco, sendo que os valores referentes ao extrato aquoso de polpa e ao extrato etanólico misto não são significativamente diferentes entre si, situação que se opõe aos restantes valores. O valor de flavonoides mais elevado corresponde ao extrato etanólico de grão, seguido do extrato etanólico misto e aquoso de polpa. Porém estes dois últimos apresentaram valores significativamente menores que os apresentados pelo extrato de grão. Por fim, o extrato etanólico de polpa foi o que possuiu o menor teor em flavonoides totais. De um modo geral pode dizer-se que o teor em flavonoides totais acompanhou a tendência verificada nos compostos fenólicos totais (grão>polpa aquoso>misto etanólico>polpa etanólico). Mais uma vez a extração com

água, nas condições em que foi realizada, mostrou ser mais eficiente a extrair os compostos fenólicos da polpa de alfarroba.

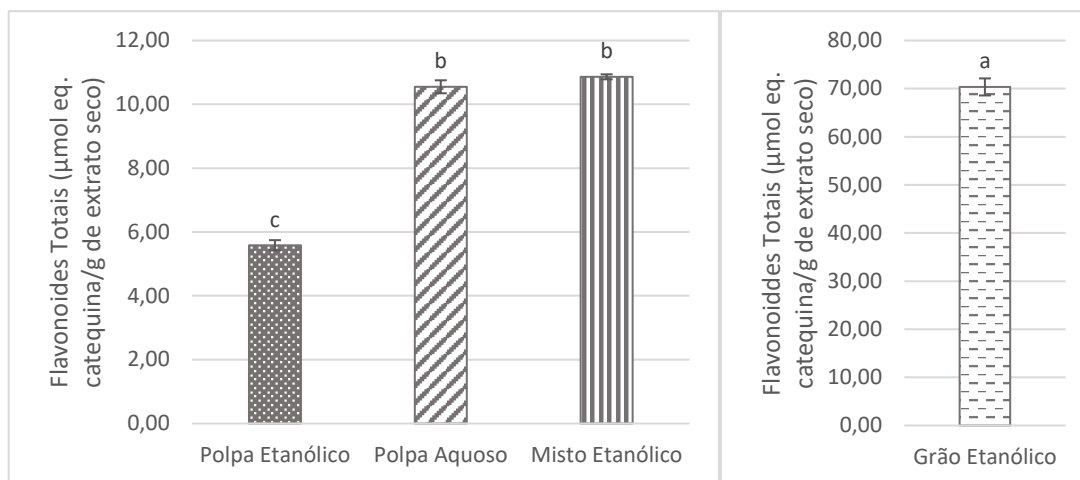


Figura 3.2 – Teor em flavonoides totais nas diferentes amostras testadas. Amostras com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Num estudo realizado por Benkovic *et al.* (2017), onde foram igualmente estudadas as propriedades dos diferentes componentes da alfarroba, os resultados obtidos foram de 11,55 mg, 2,65 mg e 6,56 mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato de farinhas contendo polpa e grão da alfarroba em acetona (70%). Para extratos de farinha sem a presença do grão, os valores obtidos foram de 13,38 mg, 11,98 mg e 11,94 mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. Num outro estudo realizado por Custódio *et al.* (2011), analisaram-se os valores totais em flavonoides referentes a extratos metanólicos de farinha de gérmen de semente de alfarroba, provenientes de seis diferentes cultivares desta árvore. Os autores verificaram variações significativas entre cultivares tendo os valores oscilado entre os 10 mg e os 22 mg de equivalentes de rutina por grama de extrato. Por outro lado, Custódio *et al.* (2015) dosearam os flavonoides em extratos aquosos de farinha de gérmen de alfarroba e de polpa tendo encontrado valores de 0,3 mg de equivalentes de rutina por grama de extrato para a farinha de gérmen de alfarroba não tendo conseguido detetar estes compostos no extrato da polpa.

A comparação direta dos resultados obtidos experimentalmente com os resultados da literatura não é possível devido às diferentes unidades utilizadas. No entanto, tal como Custódio *et al.* (2015), também neste trabalho se detetou um nível mais elevado de flavonoides no extrato de grão em comparação com os extratos contendo polpa. Contudo, no presente caso foi possível quantificar os flavonoides nestes extratos, incluindo no extrato aquoso. Mais uma vez a variabilidade verificada no teor de flavonoides totais pode dever-se à utilização de técnicas de moagem distintas, diferentes tamanhos de partículas, às condições de preparação dos extratos, podendo ser atribuída, igualmente, à proveniência da alfarrobeira, às condições climáticas em que se desenvolveu, bem como o estado de maturação do fruto, que em muito influencia as suas propriedades.

3.3. Determinação da atividade antioxidante dos constituintes da alfarroba

Uma vez que não existe um método universal para analisar a atividade antioxidante de uma amostra, por esta poder ser exercida através de diferentes mecanismos, aplicaram-se diversos ensaios para avaliar o potencial antioxidante dos extratos. Assim, realizaram-se dois ensaios de determinação da capacidade de sequestro de espécies radicalares (sequestro dos radicais DPPH[•] e anião superóxido) e dois ensaios de determinação da capacidade redutora (ensaios FRAP e CUPRAC).

3.3.1 Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH[•]

A figura 3.3 permite verificar que se verificou a existência de uma relação linear entre o aumento da percentagem de sequestro do radical DPPH[•] (percentagem de inibição) e o aumento da concentração de amostra na mistura reacional. Assim, para todos os extratos, à medida que a concentração de extrato foi aumentando, a percentagem de captura do radical também aumentou. Contudo, esse aumento foi muito mais acentuado com o extrato de grão do que com todas as restantes amostras o que evidencia a maior capacidade de sequestro deste radical exercida por este extrato.

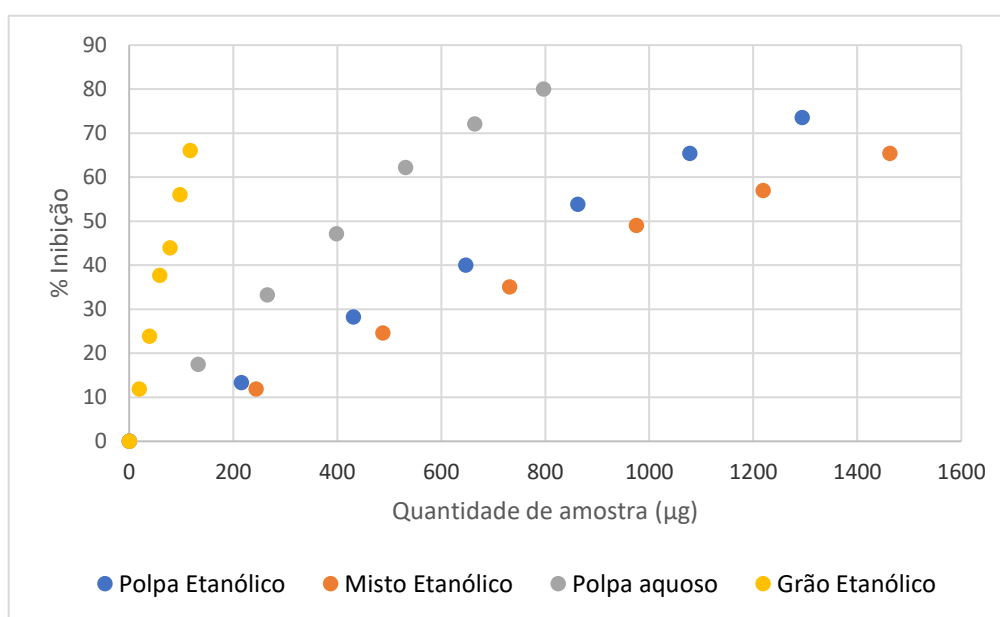


Figura 3.3 – Percentagem de inibição em função da quantidade de amostra, para os diferentes extratos analisados.

Num estudo realizado por Seed *et al.* (2012), concluiu-se que a percentagem de inibição no ensaio com o DPPH[•] aumenta com o aumento da concentração do extrato. Por sua vez, Viuda-Martos *et al.* (2009) estudou a atividade antioxidante de óleos essenciais de várias plantas utilizadas na dieta mediterrânea. Segundo este estudo, os valores de inibição no ensaio com o DPPH[•] apresentam-se muito elevados, aumentando com a concentração de extrato estudada.

Através dos dados apresentados na figura 3.4 foi possível determinar a quantidade de amostra necessária para sequestrar 50% do radical DPPH[•] presente na mistura reacional (IC50) (figura 3.4).

Quanto mais pequeno for este valor maior será a capacidade antioxidante da amostra, uma vez que um valor mais baixo significa que é necessária uma quantidade de amostra mais baixa para se conseguir a mesma percentagem de sequestro. O extrato etanólico de grão apresentou um valor de IC50 de 85,9 µg, muito inferior ao dos restantes extratos analisados. Contrariamente, o extrato misto etanólico apresentou o valor mais elevado de IC50 (1066,7 µg). Assim, o grão é o extrato que necessita de uma menor quantidade para provocar metade da resposta máxima.

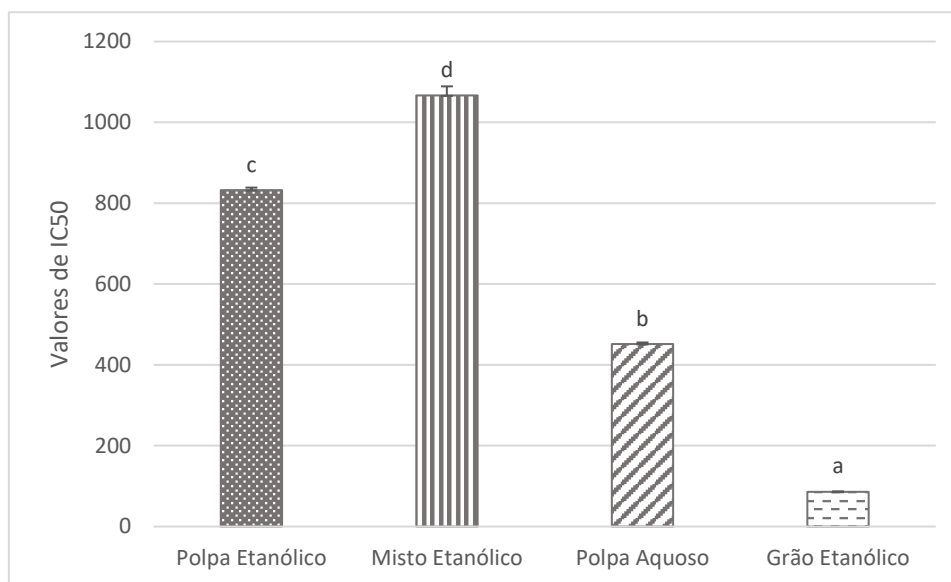


Figura 3.4 – Valores de IC50 obtidos nas diferentes amostras testadas. Amostras com letras diferentes significam valores de IC50 significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos para a capacidade de sequestro do DPPH[•] foram ainda expressos em equivalentes de ácido ascórbico (figura 3.5), tendo variado entre os 23,95 µg e os 232,67 µg de equivalentes de ácido ascórbico por mg de extrato seco, sendo todos os valores significativamente diferentes entre si. Como seria esperado, o extrato de grão foi o que apresentou o valor mais elevado, o que revela que este possui a maior capacidade de sequestro do DPPH[•] e, consequentemente, possui uma maior atividade antioxidante, em oposição ao extrato misto etanólico, que apresenta o menor valor de capacidade de sequestro do DPPH[•].

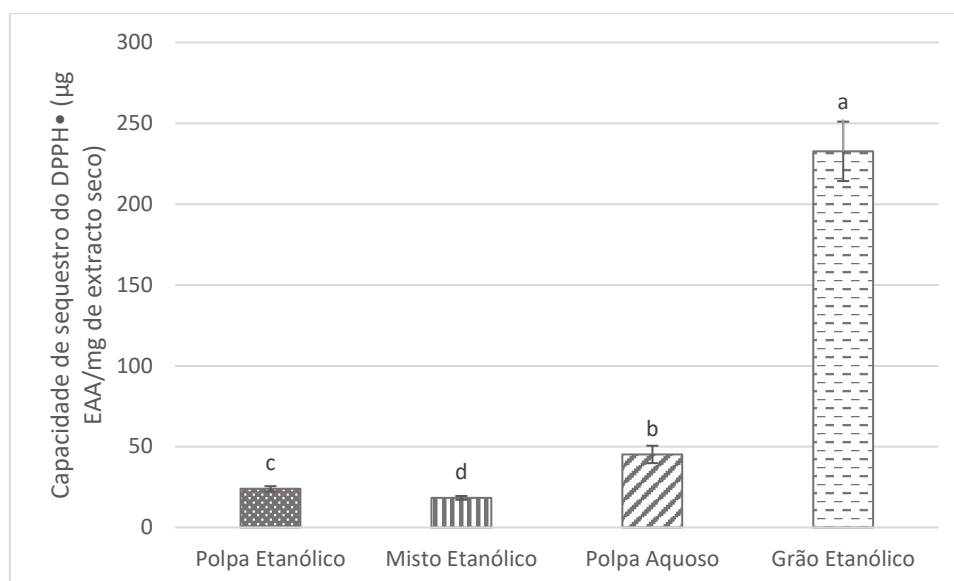


Figura 3.5 – Valores da capacidade de sequestro do radical DPPH• nas diferentes amostras testadas. Amostras com letras diferentes significam quantidades de equivalentes de ácido ascórbico significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Num estudo publicado por Benkovic *et al.* (2017), referente às propriedades de diferentes farinhas de alfarroba, os resultados respeitantes aos extratos de farinha contendo casca e semente foram de 23,02 µmol, 56,87 µmol e 68,07 µmol de equivalentes de trolox por grama de extrato. Os resultados alusivos a farinhas de alfarroba sem as sementes foram relativamente superiores, com valores de 96,37 µmol, 88,52 µmol e 104,23 µmol de equivalentes de trolox por grama de amostra. Em ambos os casos, os resultados mais elevados foram alcançados com as amostras com maior concentração de compostos fenólicos totais.

Maizura *et al.* (2011), ao estudarem o teor em fenóis totais e as propriedades antioxidantes de extratos de plantas, obtiveram resultados de inibição referentes ao ensaio com o DPPH• entre os 70% e os 80%, verificando a existência de uma correlação positiva entre o teor em fenóis totais e a percentagem de inibição medida. Assim, os extratos que possuíam um teor em fenóis totais mais elevado, apresentaram valores mais elevados na inibição do DPPH•.

Estes resultados encontram-se em concordância com os obtidos experimentalmente, onde os extratos de polpa aquoso e grão etanólico, que possuem um teor em fenóis totais superior, foram, do mesmo modo, aqueles que apresentaram percentagens de inibição para o DPPH• mais elevados.

3.3.2 Determinação da atividade antioxidante por sequestro do radical anião superóxido

Todas os extratos conseguiram sequestrar o radical anião superóxido uma vez que, em comparação com o controlo, todas levaram a uma diminuição da velocidade de formação do formazano, resultante da redução do NBT²⁺ pelo radical anião superóxido gerado no sistema NADH/PMS. Assim,

para todas as amostras verificou-se uma diminuição do aumento da absorvância a 560 nm em função do tempo, visível pelo menor declive das retas de absorvância em função do tempo, que traduz a diminuição da velocidade de redução do NBT²⁺. Esta diminuição foi dependente da dose, tendo aumentado com o aumento da concentração de amostra na mistura reacional (figuras 3.6, 3.7, 3.8 e 3.9).

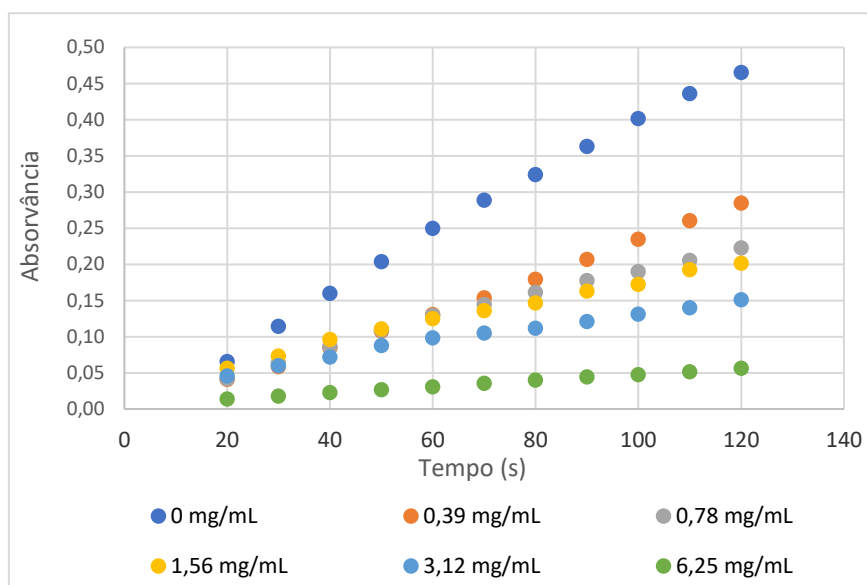


Figura 3.6 – Variação da absorvância em função do tempo, na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de grão.

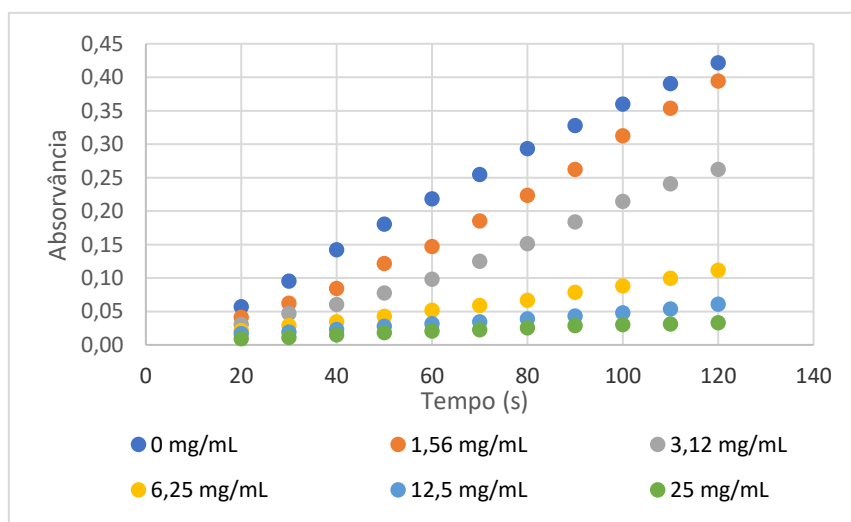


Figura 3.7 – Variação da absorvância em função do tempo, na presença de diferentes concentrações de extrato aquoso de polpa.

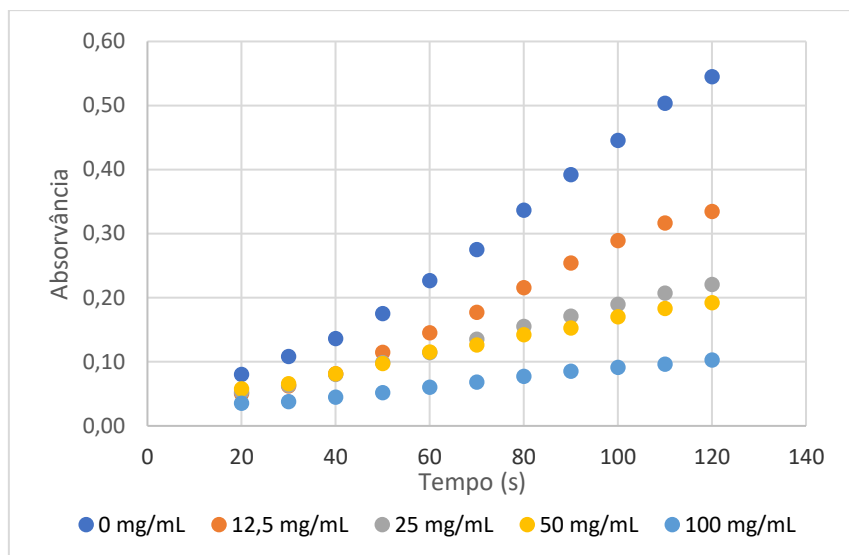


Figura 3.8 – Variação da absorvância em função do tempo, na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico misto.

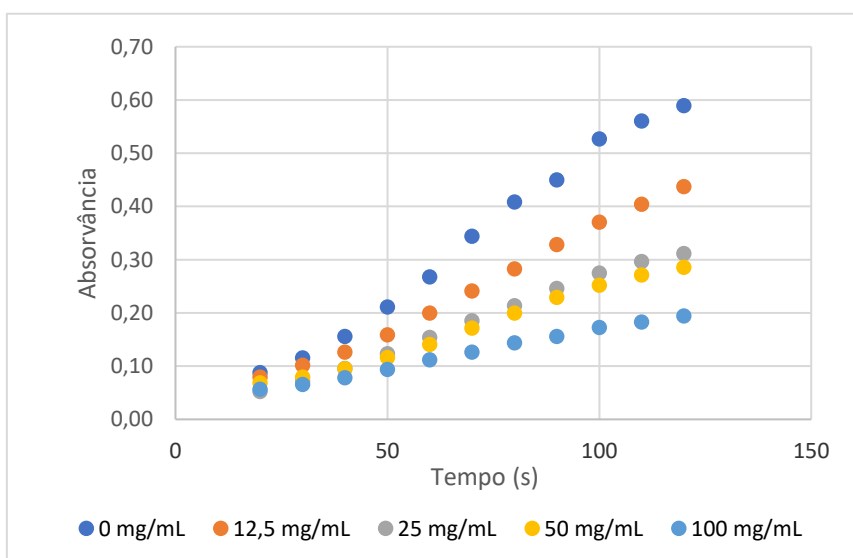


Figura 3.9 – Variação da absorvância em função do tempo, na presença de diferentes concentrações de extrato etanólico de polpa.

A realização das curvas de percentagem de inibição da formação de formazano em função da quantidade de amostra que se encontrava presente na mistura reacional em que se verificou essa inibição (figura 3.10 A a E), permitiu calcular os valores de percentagem de amostra na mistura reacional que causaram 50% de inibição da formação de formazano, ou seja, o valor de IC50 para as diferentes amostras (tabela 3.1).

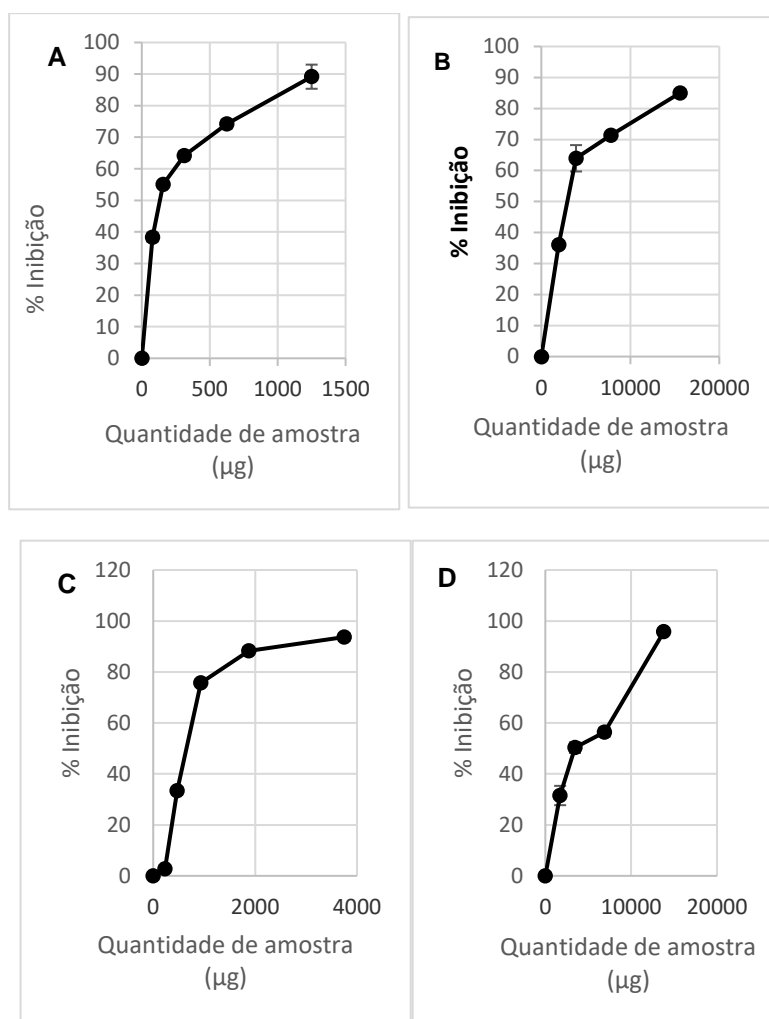


Figura 3.10 – Percentagem de inibição em função da quantidade de amostra na mistura reacional, para os diferentes extratos analisados (A) extrato etanólico de grão; (B) extrato etanólico misto; (C) extrato aquoso de polpa; (D) extrato etanólico de polpa.

Tabela 3.1 – Valores de IC50 obtidos na determinação da capacidade de sequestro do superóxido nas diferentes amostras.

Amostra	IC50 (µg)
Grão Etanólico	131,79 ^a ± 1,37
Polpa Aquoso	672,39 ^b ± 4,64
Misto Etanólico	2979,44 ^c ± 162,77
Polpa Etanólico	4224,49 ^d ± 474,18

Amostras com letras diferentes significam valores de IC50 significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido revela uma importância extrema e uma grande relevância biológica, uma vez que a formação desta espécie radicalar ocorre *in vivo*.

Através da análise da figura 3.10, bem como da tabela 3.1, verifica-se que existem algumas diferenças entre os quatro extratos estudados. Respetivamente aos valores de IC₅₀, é possível observar que os valores variaram entre os 131,79 µg de extrato seco e os 4224,49 µg de extrato seco, com todos os extratos a apresentar diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). A amostra que apresentou um valor de IC₅₀ mais elevado foi o extrato etanólico de polpa, seguindo-se o misto etanólico e o polpa aquoso. Por sua vez, a amostra que apresentou um valor de IC₅₀ mais baixo foi o extrato etanólico de grão, que apresentou um valor bastante distinto dos restantes, significando que é necessária uma quantidade muito menor de amostra para originar o mesmo efeito de sequestro do radical anião superóxido, significando que é um antioxidante mais eficaz.

O radical anião superóxido é extremamente prejudicial para os componentes celulares. A capacidade de sequestro deste radical em extratos de plantas tem mostrado ser diretamente proporcional à concentração em compostos como os fenóis e, em particular, dos flavonoides (Hazra *et al.*, 2008). Zhishen *et al.* (1999), ao investigar o teor em flavonoides em folhas, galhos e casca de amoreira e o seu efeito sobre o sequestro do radical anião superóxido, demonstrou que os flavonoides são importantes agentes no sequestro destes radicais.

Amarowicz *et al.* (2004) também estudou a capacidade de sequestro de radicais livres e a atividade antioxidante de diversas espécies de plantas, concluindo que as catequinas, polifenóis da família dos flavonoides, possuem uma grande capacidade de sequestro do radical anião superóxido. Estes compostos têm uma variedade de funções fisiológicas e podem atuar como antioxidantes *in vitro* e *in vivo*. Os flavonoides atuam como sequestrantes de espécies reativas de oxigénio antes que estas danifiquem os componentes celulares. A sua eficácia depende do número e arranjo dos grupos hidroxilo que se ligam às estruturas anelares (Gill e Tuteja, 2010).

Associando as investigações já publicadas aos resultados obtidos no presente estudo, também se observa uma associação entre o conteúdo em compostos fenólicos e a capacidade de sequestro do radical anião superóxido. Contudo, essa associação não parece ser especificamente devida aos flavonoides dado que os extratos etanólicos de polpa e misto apresentaram teores semelhantes de flavonoides totais, apresentando uma diferença acentuada na capacidade de sequestro do radical anião superóxido.

3.3.3 Determinação da atividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP

Os resultados referentes à atividade de redução do Fe(III) a Fe(II), obtidos recorrendo ao ensaio FRAP, encontram-se apresentados na figura 3.11.

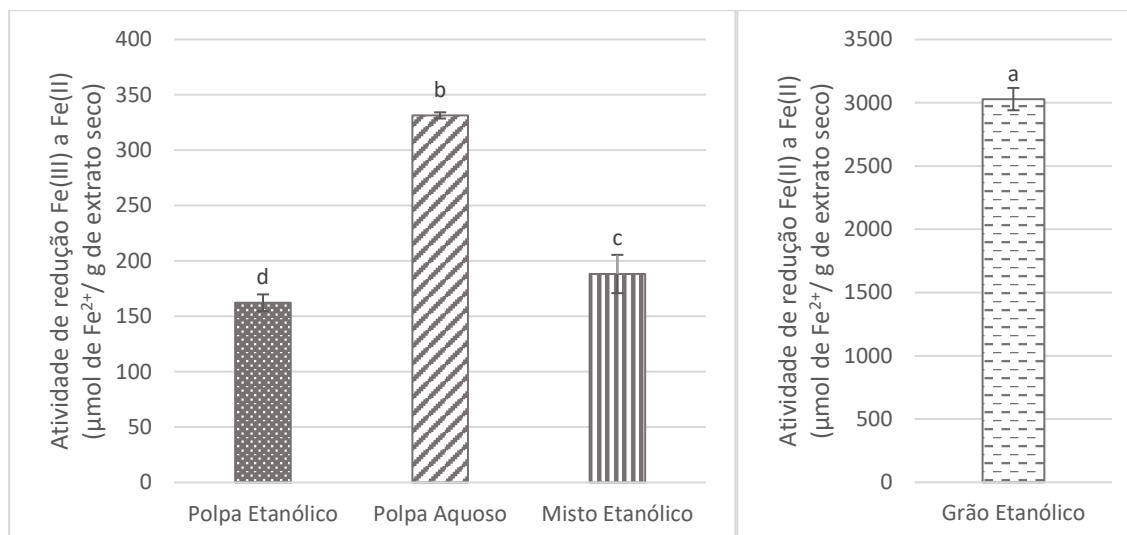


Figura 3.11 – Resultados obtidos através do ensaio FRAP nas diferentes amostras testadas. Amostras com letras diferentes significam valores de FRAP significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Após a análise dos resultados obtidos, verifica-se que os diferentes extratos apresentam valores de FRAP que variaram entre os 162,29 e os 3028,88 μmol de Fe^{2+} por grama de extrato seco, sendo todos os resultados significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$). O menor valor foi obtido com o extrato etanólico de polpa e o valor mais elevado com o extrato etanólico de grão, sendo que este extrato apresentou um valor de FRAP cerca de dez vezes superior às restantes amostras, revelando que o extrato de grão possui uma atividade redutora, detetada pelo ensaio FRAP, muito superior aos restantes extratos.

Durazzo *et al.* (2014), avaliaram a atividade antioxidante de extratos, obtidos por extração sequencial com metanol/água (50:50 v/v, pH 2) e acetona/água (70:30 v/v), de farinhas de diferentes partes da semente de alfarroba (goma, gérmen e semente inteira), tendo obtido resultados no ensaio FRAP que variaram entre os 11,62 e os 439,02 μmol de Fe^{2+} por grama de farinha, sendo o valor mais elevado obtido com a farinha proveniente do grão inteiro e o mais baixo com a goma. Uma vez que no trabalho de Durazzo *et al.* (2014) os valores estão expressos por grama de farinha e não de extrato seco não é possível fazer uma comparação direta com os resultados deste estudo. Numa investigação efetuada por Dudonné *et al.* (2009), onde foi realizado um estudo comparativo das propriedades antioxidantes e teor fenólico de 30 extratos de plantas com interesse industrial, foi obtido um resultado para o extrato aquoso da vagem da alfarroba de 680 μmol de Fe^{2+} por grama de amostra. O valor obtido difere um pouco do obtido neste estudo, uma vez que a vagem, correspondente ao extrato misto, apresentou um valor de cerca de 189 μmol de Fe^{2+} por grama de extrato seco.

Por outro lado, num estudo realizado por Clarke *et al.* (2013), foi confirmada uma correlação elevada entre o teor em compostos fenólicos de extratos de plantas e o seu valor de FRAP, existindo uma relação diretamente proporcional entre ambos. Da mesma forma, análises efetuadas por Dundonné *et al.* (2009) e por Maizura *et al.* (2011) concluíram que existe de facto uma relação entre o teor fenólico de uma amostra e o seu valor de FRAP. Também no presente estudo esta relação

acontece, uma vez que as amostras que possuem um teor mais elevado de compostos fenólicos, o extrato de polpa aquoso e o extrato etanólico de grão, foram aquelas que apresentaram os valores de FRAP mais elevados.

3.4. Determinação da redução do Cu (II) pelo ensaio CUPRAC

Os resultados referentes ao ensaio CUPRAC encontram-se representados na figura 3.12.

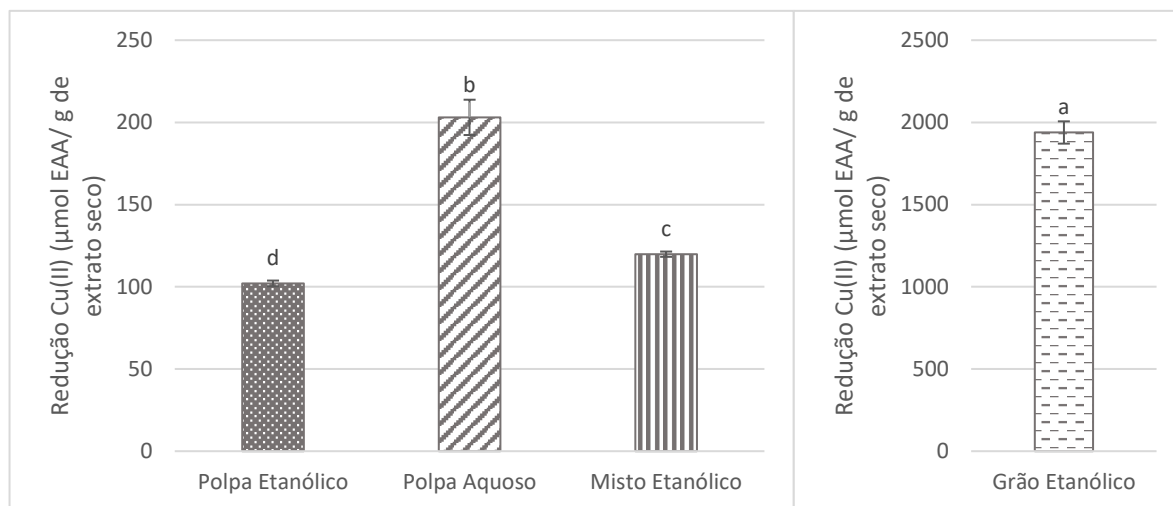


Figura 3.12 – Resultados obtidos através do ensaio CUPRAC nas diferentes amostras testadas. Amostras com letras diferentes significam valores de CUPRAC significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os valores obtidos através do ensaio CUPRAC são significativamente diferentes ($p < 0,05$), variando estes entre os 102,04 e os 1938,69 μmol de equivalentes de ácido ascórbico por g de extrato seco. O extrato etanólico de polpa foi o que apresentou o menor valor, tendo o maior valor sido obtido com a amostra de grão etanólico. A amostra de grão, por sua vez, tem uma capacidade de redução do Cu(II) cerca de dez vezes superior às restantes amostras. Comparando os resultados do ensaio CUPRAC com os do ensaio FRAP, verifica-se que a ordem de atividade dos extratos se mantém idêntica, com o extrato etanólico de polpa a ser o que apresentou a menor capacidade redutora, seguido do extrato etanólico misto, aquoso de polpa e etanólico de grão.

Este método apresenta uma relação linear com o teor em fenóis totais, como indica Apak *et al.* (2006) no estudo do conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante de chás feitos a partir de plantas, sendo o valor de CUPRAC tanto maior quanto maior for o teor em fenóis de uma amostra. Esta correlação é também indicada numa investigação efetuada por Apak *et al.* (2008). Estes estudos corroboram os resultados obtidos experimentalmente, onde os extratos que possuem um maior teor em compostos fenólicos são os mesmos que apresentaram valores de CUPRAC superiores.

O reagente do CUPRAC é seletivo, uma vez que possui um potencial redox baixo (Apak *et al.*, 2008; Ozyuewk *et al.*, 2008). A reação redox que origina um quelante colorido de Cu(I) é relativamente

insensível a um número de parâmetros que afetam negativamente certos reagentes, como o DPPH[•], tais como ar, luz solar, humidade e pH, até um certo ponto. A reação redox ocorre a pH 7, em oposição às condições ácidas do FRAP ou condições básicas do ensaio de Folin-Ciocalteu. Em condições mais ácidas que o pH fisiológico, a capacidade redutora pode ser suprimida devido à protonação em compostos antioxidantes. Em condições básicas, a dissociação de prótons fenólicos aumentaria a capacidade de redução da amostra. Este método pode ainda medir simultaneamente antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos (Apak *et al.*, 2007; Apak *et al.*, 2008).

3.5 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos diferentes extratos foi avaliada através de duas técnicas: O ensaio de difusão em placa e o ensaio pelo método de microdiluição em meio líquido.

3.5.1 Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em agar

A atividade antimicrobiana avaliada através do método de difusão em agar foi determinada através da medição dos halos de inibição, em milímetros, em volta do poço onde as diferentes amostras foram colocadas, e apresentam-se na tabela 3.2, e nas figuras 3.13 a 3.21. Foram aplicadas diferentes concentrações dos extratos nas placas Petri. Assim, no caso dos extratos de polpa (aquoso e etanólico) e misto aplicaram-se em todos os poços 40 µL de extrato com concentrações de 125 mg/mL, 250 mg/mL e 500 mg/mL, e, no caso do extrato etanólico de grão concentrações de 6,25 mg/mL, 9,5 mg/mL, 12,5 mg/mL e 25 mg/mL.

Tabela 3.2 – Diâmetro dos halos de inibição obtidos através do método de difusão em agar com os as diferentes concentrações dos extratos em estudo.

	Diâmetro do halo de inibição (mm)								
	Polpa Etanólico	Misto Etanólico		Polpa Aquoso		Grão Etanólico			
	500 mg/mL	250 mg/mL	500 mg/mL	250 mg/mL	500 mg/mL	25 mg/mL	12,5 mg/mL	9,5 mg/mL	6,25 mg/mL
Bactérias gram-positivas									
<i>S. aureus</i>	-	-	10,5±0,7	7± 0,0	12±0,0	13,8±0,5	11,5±0,6	7,5±0,7	-
MRSA	-	-	10 ± 0,0	7,5±0,7	11±0,0	14 ± 0,0	11,5±0,7	10±0,0	7,5±0,7
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	8,5±2,1	10 ± 0,0	-	-	-
<i>B. cereus</i>	8,5±0,7	8,5±0,7	11±1,4	8,0±0,0	11±0,0	14,5±0,7	12±0,0	11±0,0	10±0,0
<i>E. faecalis</i>				-	8 ± 0,0	10 ± 0,0	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	7± 0,0	9,5 ±0,7	-	-	-
<i>P. acnes</i>	-	-	11±0,0	-	12±0,0	13 ± 0,0	11 ± 0,0	9 ± 0,0	-
Bactérias gram-negativas									
<i>Salmonella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Levedura									
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	9,0 ± 0,0	-	-	-

(-): Sem halo de inibição visível.

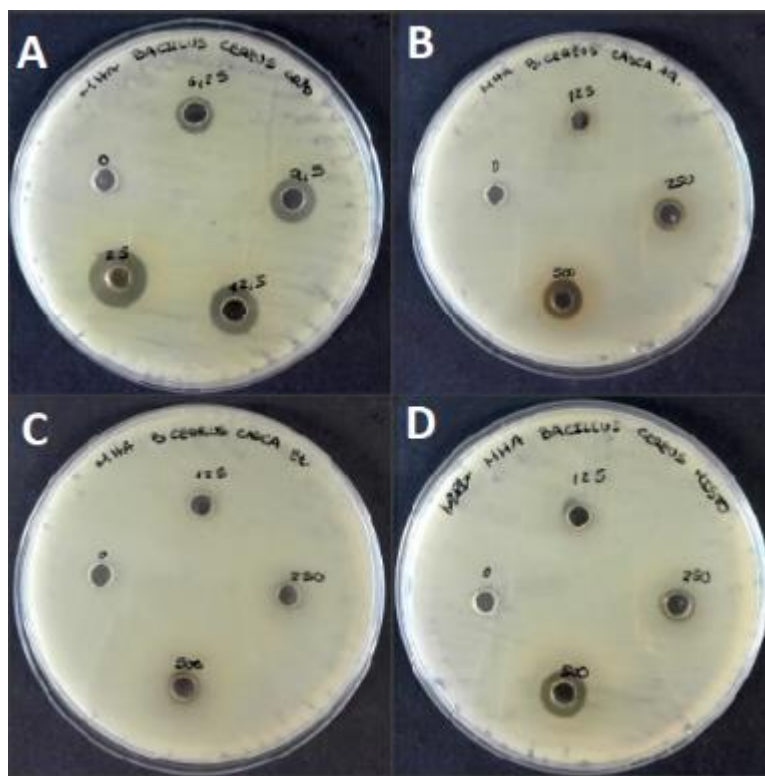


Figura 3.13 – Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A), polpa aquoso (B), polpa etanólico (C) e misto etanólico (D) para *Bacillus cereus*.

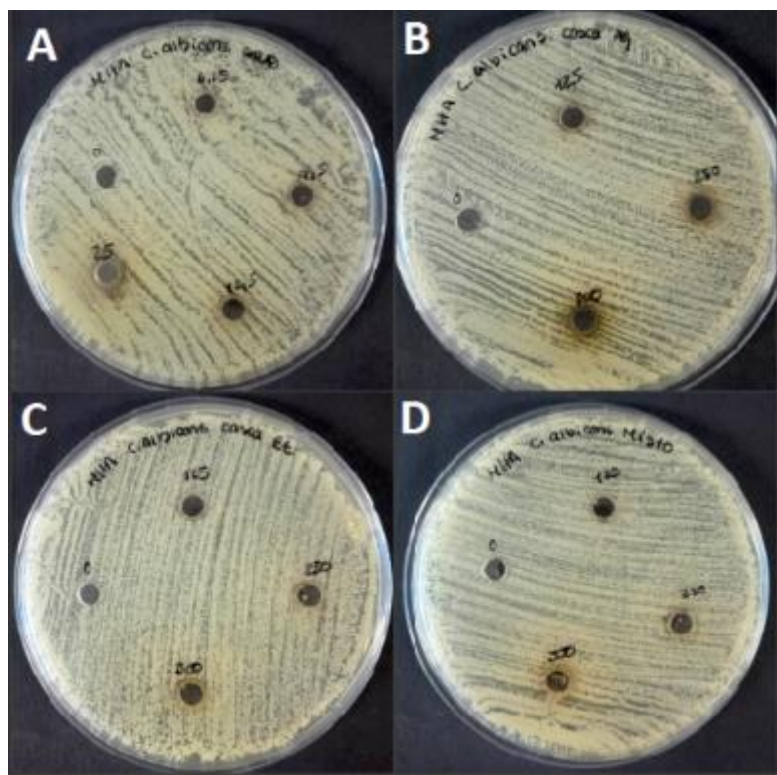


Figura 3.14 – Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A), polpa aquoso (B), polpa etanólico (C) e misto etanólico (D) para *Candida albicans*.

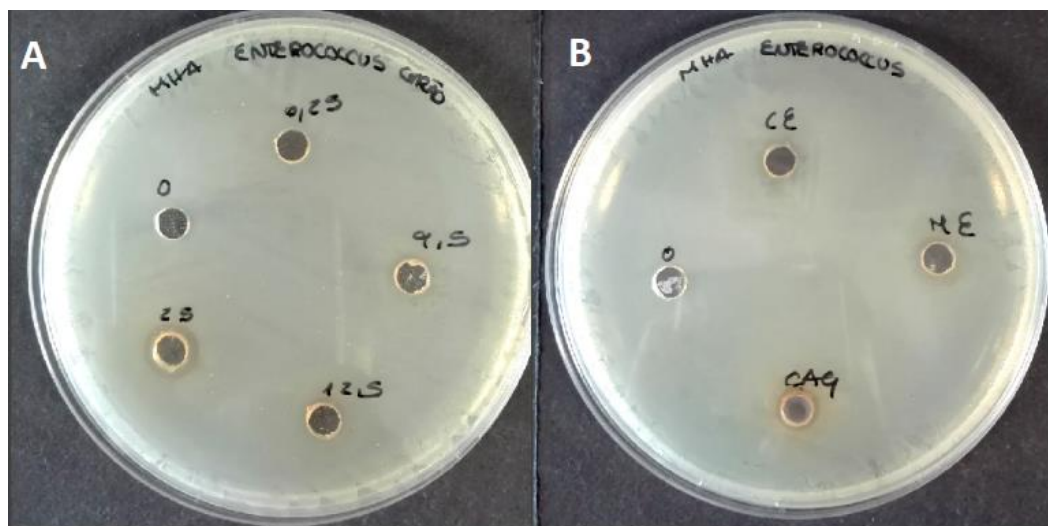


Figura 3.15 – Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A) e polpa aquoso, polpa etanólico e misto etanólico (B) para *Enterococcus faecalis*.

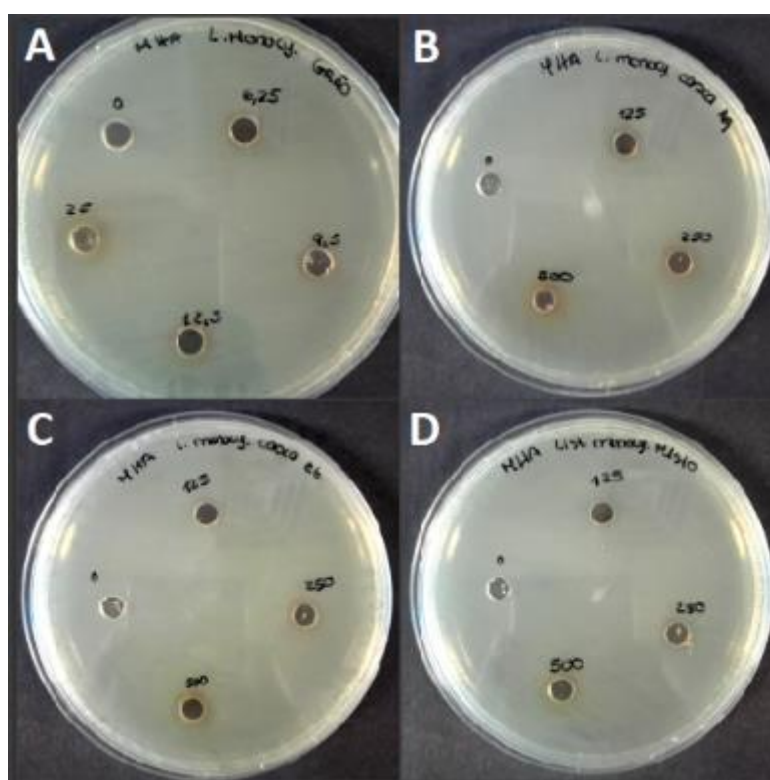


Figura 3.16 – Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A), polpa aquoso (B), polpa etanólico (C) e misto etanólico (D) para a *Listeria monocytogenes*.

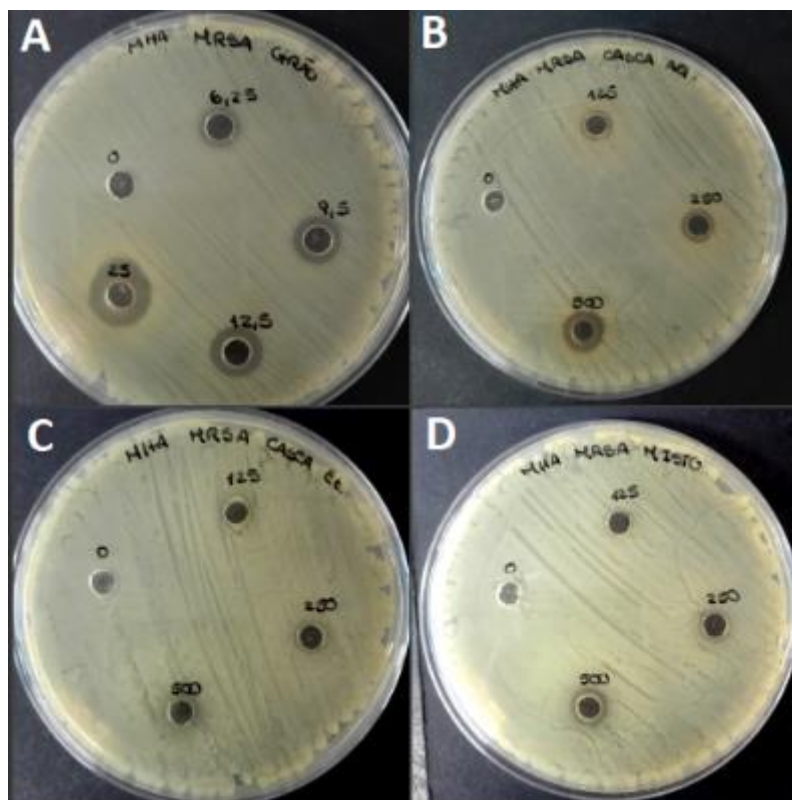


Figura 3.17 – Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A), polpa aquoso (B), polpa etanólico (C) e misto etanólico (D) para *S. aureus* resistente a metilina.

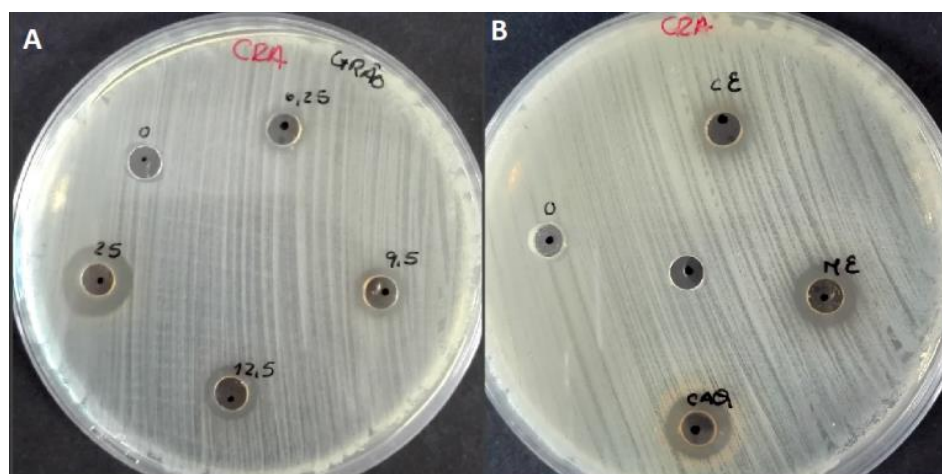


Figura 3.18 – Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A) e polpa aquoso, polpa etanólico e misto etanólico (B) para *Propionibacterium acnes*.

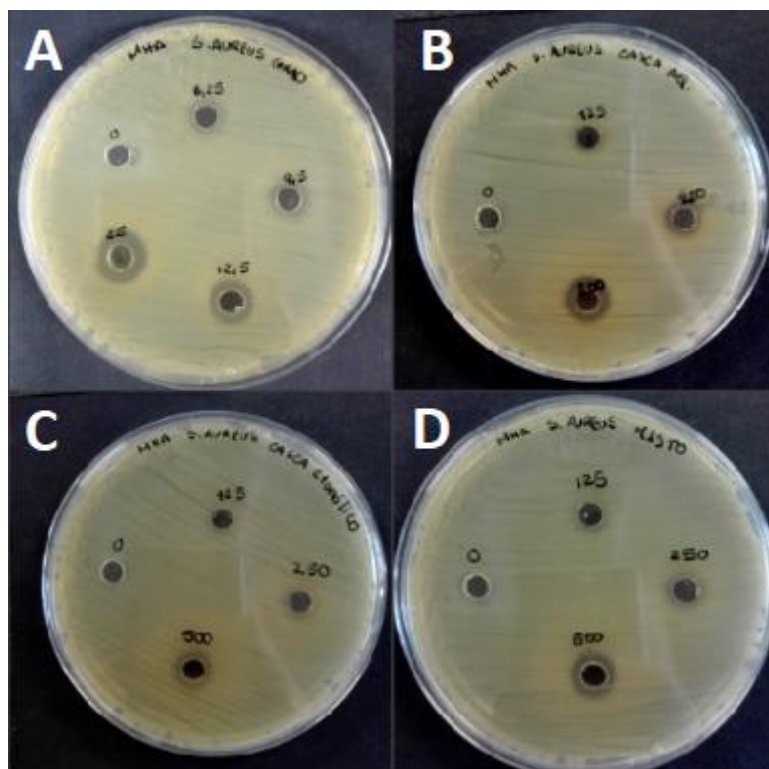


Figura 3.19 – Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A), polpa aquoso (B), polpa etanólico (C) e misto etanólico (D) para *Staphylococcus aureus*.

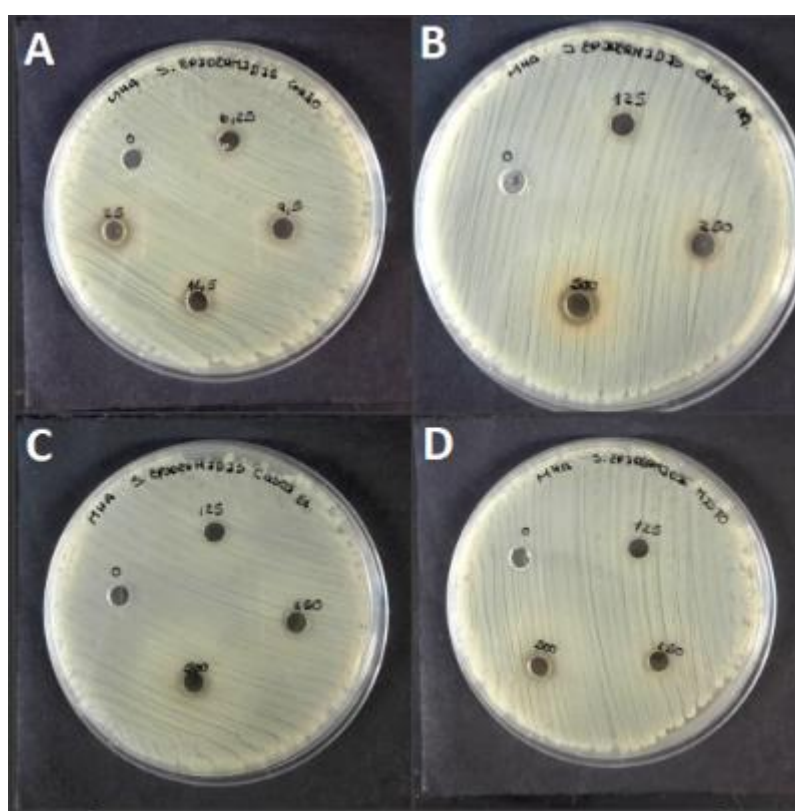


Figura 3.20 – Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão (A), polpa aquoso (B), polpa etanólico (C) e misto etanólico (D) para *Staphylococcus epidermidis*.

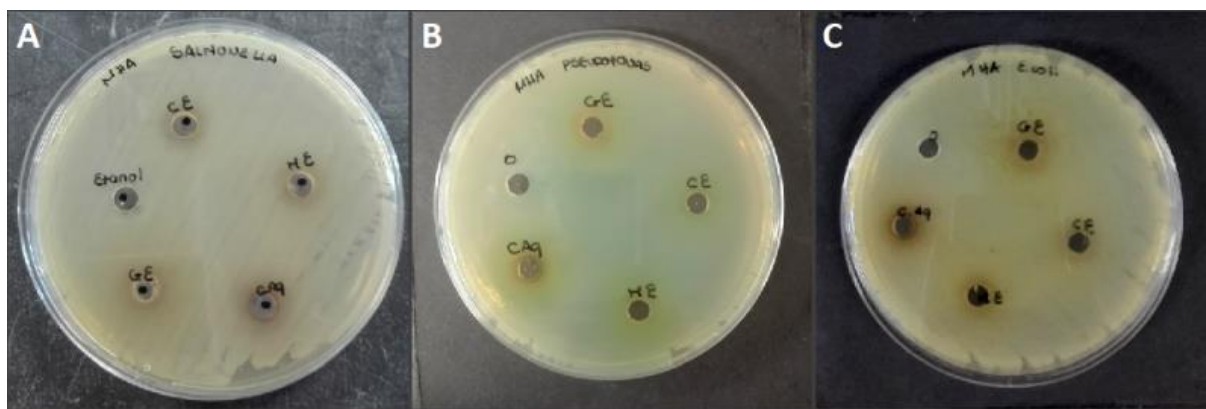


Figura 3.21 – Resultados obtidos na determinação da atividade antimicrobiana das amostras de grão, polpa aquoso, polpa etanólico e misto etanólico para *Salmonella enterica* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B) e *Escherichia coli* (C), com todos os extratos em concentrações de 500 mg/mL para as amostras de polpa e misto, e 25 mg/mL para o extrato de grão.

Através da análise da tabela 3.2 e das figuras 3.13 a 3.21, observa-se que os diferentes extratos mostraram resultados distintos para os diferentes microrganismos em estudo. Assim, para as bactérias gram-negativas, nenhum dos extratos revelou atividade antimicrobiana, uma vez que não foi possível observar nenhum halo de inibição (figura 3.21), o que sugere que nenhum componente da alfarroba possui a capacidade de inibir ou impedir o crescimento de *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Salmonella enterica*.

As bactérias gram positivas que se revelaram mais sensíveis foram o *B. cereus*, o *S. aureus* e o MRSA e o *P. acnes*. O extrato de grão foi o que apresentou maior atividade antimicrobiana, destacando-se dos restantes. Com efeito, com este extrato foi possível verificar a inibição do crescimento do *B. cereus* e do MRSA com a concentração mais baixa testada (6,25 mg/mL). O extrato etanólico de polpa foi o que apresentou uma atividade menor, uma vez que apenas foi possível observar um halo de inibição para o *B. cereus* e apenas quando se aplicou a concentração mais elevada. O extrato etanólico misto também se apresentou fraco relativamente à atividade antimicrobiana, embora com uma atividade um pouco superior à do extrato etanólico de polpa. O extrato de polpa aquoso apresentou uma atividade antimicrobiana um pouco superior aos dois anteriores. No entanto, não foi possível detetar atividade antimicrobiana contra nenhum dos microrganismos estudados quando estes três extratos foram testados na concentração mínima aplicada (125 mg/mL). Relativamente ao extrato etanólico de grão, os resultados obtidos diferem muito em relação aos restantes extratos. Este extrato apresentou atividade antimicrobiana contra todas as bactérias gram-positivas estudadas, com concentrações muito inferiores às dos restantes extratos, precisando no máximo de 25 mg/mL, contrastando com a concentração máxima para os restantes extratos que foi de 500 mg/mL.

A levedura estudada, *C. albicans*, revelou-se resistente à maioria dos extratos de alfarroba, apresentando apenas um halo de inibição de 9 mm quando se aplicou a concentração mais elevada (25 mg/mL) do extrato etanólico de grão.

Analisando todos os resultados obtidos ao longo deste estudo, é possível encontrar uma correlação entre a atividade microbiana de cada extrato e a quantidade de compostos fenólicos presentes nos mesmos. O extrato que possui um maior teor em fenóis, ou seja, o extrato de grão, é também aquele que apresenta uma atividade antimicrobiana superior, inibindo o crescimento de todas as bactérias gram-positivas e também da levedura. Este extrato apenas não revelou atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-negativas. Por oposição, a amostra de polpa etanólica, que apresentou os resultados menores para o teor em fenóis totais, foi igualmente a que apresentou uma atividade antimicrobiana menor.

Vários estudos realizados anteriormente relevam, da mesma forma, uma relação entre o teor em fenóis totais e as atividades antioxidante e antimicrobiana (Shan *et al.*, 2007; Hyder *et al.*, 2010). Um estudo realizado por Klancnik *et al.* (2010) avaliou a atividade antimicrobiana de diversos extratos de plantas, tendo encontrado uma relação linear entre o teor em compostos fenólicos e a atividade antimicrobiana. Compostos como os flavonoides, os taninos e outros fenóis revelam-se extremamente importantes como mecanismo de defesa das plantas contra vários microrganismos (Hyder *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação destes compostos antimicrobianos depende da sua estrutura e da sua interação com os microrganismos. A característica dos microrganismos que mais influencia a ação destes compostos é a constituição da sua parede celular, nomeadamente no que diz respeito à presença ou não da membrana externa. Quando comparadas com as bactérias gram-positivas, as bactérias gram-negativas são mais resistentes à maioria destes agentes antimicrobianos naturais, pelo facto de possuírem uma membrana externa com lipopolissacáridos, que constitui uma barreira contra a entrada destes compostos (Ray, 2004). No entanto, tal facto não significa que todas as bactérias gram-positivas sejam sempre mais vulneráveis (Tajkarimi *et al.*, 2010), como pôde também ser verificado no presente estudo, analisando os resultados obtidos relativamente a bactérias como *E. faecalis* ou *L. monocytogenes*.

3.5.2 Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em meio líquido

De forma a quantificar a atividade antimicrobiana detetada no método de difusão em agar, foi efetuada a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) pelo método da microdiluição. Esta análise só foi realizada para o extrato de grão uma vez que os restantes extratos só apresentaram atividades em concentrações muito elevadas. Este ensaio só foi igualmente realizado com as bactérias gram-positivas, uma vez que as bactérias negativas apresentaram resultados negativos no método por difusão em agar. Os valores de MIC obtidos no ensaio de microdiluição encontram-se na tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Concentração mínima inibitória para o extrato etanólico de grão

Bactéria	Concentração mínima inibitória (MIC) (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	3,125
MRSA	3,125
<i>S. epidermidis</i>	6,25
<i>P. acnes</i>	3,125
<i>E. faecalis</i>	6,25
<i>B. cereus</i>	< 0,78
<i>L. monocytogenes</i>	6,25

Após a análise da tabela 3.3 é possível observar que os MICs para a maioria das bactérias se encontram em concentrações entre os 3,125 mg/mL e os 6,25 mg/mL, encontrando-se apenas o MIC para *B. cereus* fora deste intervalo. Com efeito, todas as concentrações testadas foram capazes de inibir totalmente o crescimento desta bactéria, pelo que não se conseguiu chegar ao valor do MIC. A bactéria mais sensível foi assim o *B. cereus*, seguido das *S. aureus*, MRSA e *P. acnes* que apresentaram um MIC de 3,125 mg/mL.

É possível verificar ainda que os resultados obtidos pelo método de microdiluição estão de acordo com os resultados obtidos pelo método de difusão em agar, uma vez que as bactérias que se mostraram mais sensíveis num ensaio foram, igualmente, as que se mostraram mais sensíveis no outro. É igualmente possível confirmar que este método é de facto mais sensível relativamente ao método por difusão em agar, como anteriormente concluiu Eloff (1998), uma vez que as concentrações inibitórias foram muito menores. Apesar do método por difusão em agar ser amplamente utilizado, o método da microdiluição tem a vantagem de utilizar menores quantidades de meio e poder ser utilizado num número elevado de amostras, para além da sua já referida maior sensibilidade (Ostrosky *et al.* 2007).

As bactérias que se mostraram sensíveis ao extrato de grão são microrganismos que podem causar infeções alimentares (*S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*) e/ou infeções na pele (*S. aureus*, *E. faecalis*, *S. epidermidis* e *P. acnes*) mais ou menos graves dependendo do estado de saúde do hospedeiro e da patogenicidade do microrganismo (Harvey *et al.*, 2007). O facto do extrato ter sido ativo contra estas bactérias sugere que ele possa ser aplicado como conservante alimentar ou possa ser aplicado em produtos tópicos, protegendo a pele contra os microrganismos deste género. Por sua vez, a incorporação deste extrato em produtos tópicos de utilização hospitalar poderia contribuir para a prevenção e diminuição das infeções oportunistas causadas pela utilização prolongada de antibióticos em meio hospitalar. Neste contexto destaca-se a sua ação contra o MRSA, uma bactéria multirresistente que constitui um problema sério especialmente em ambiente hospitalar. Por outro lado, a sua ação contra a *P. acnes*, sugere igualmente que este extrato possa ter potencial para ser incorporado em produtos tópicos como princípio ativo no combate à acne.

3.6. Avaliação da atividade mutagénica através do Teste de Ames

Nos diferentes componentes da alfarroba, foi avaliada a sua atividade mutagénica através da realização do teste de Ames em duas estirpes de Ames: TA100 e TA102. Os resultados obtidos encontram-se presentes nas tabelas 3.4 e 3.5.

Tabela 3.4 – Número de revertentes/placa verificados com a estirpe TA100 em presença de diferentes quantidades de extrato.

Extrato (µL)	Polpa Etanólico	Misto Etanólico	Polpa Aquoso	Grão Etanólico
0	181 ± 29,3	181 ± 29,3	181 ± 29,3	170 ± 0,6
12,5	176 ± 10,4	160 ± 21,5	156 ± 4,5	205 ± 22,6
25	179 ± 11,4	148 ± 3,2	159 ± 7,4	215 ± 8,7
37,5	180 ± 7,6	149 ± 15,0	146 ± 7,9	251 ± 21,5
50	176 ± 19,3	159 ± 2,1	153 ± 23,6	248 ± 17,6

Através da análise da tabela 3.4, é possível afirmar que nenhum dos extratos analisados possui um efeito mutagénico, uma vez que não existe a duplicação dos revertentes espontâneos em nenhuma quantidade de extrato estudada, não se verificando um efeito dose-resposta. Assim, conclui-se que nenhum dos extratos é mutagénico para a estirpe TA100.

Tabela 3.5 – Número de revertentes/placa verificados com a estirpe TA102 em presença de diferentes quantidades de extrato.

Extrato (µL)	Polpa Etanólico	Misto Etanólico	Polpa Aquoso	Grão Etanólico
0	335 ± 13,0	335 ± 13,0	272 ± 16,8	271 ± 2,52
12,5	379 ± 15,4	386 ± 19,5	310 ± 27,6	297 ± 29,7
25	374 ± 16,2	395 ± 32,0	293 ± 21,1	317 ± 25,3
37,5	407 ± 4,0	414 ± 11,1	297 ± 30,7	345 ± 16,1
50	392 ± 22,1	417 ± 11,9	332 ± 25,8	388 ± 20,4

Através da análise da tabela 3.5, é possível afirmar que nenhum dos extratos analisados possui um efeito mutagénico, uma vez que não existe a duplicação dos revertentes espontâneos em nenhuma quantidade de extrato estudada, não se verificando um efeito dose-resposta, concluindo-se que nenhum dos extratos é mutagénico para a estirpe TA102.

Analisando globalmente o teste de Ames para a determinação da atividade mutagénica, é possível inferir que nenhum dos extratos de alfarroba apresentou atividade mutagénica, uma vez que se apresentou negativo nas duas estirpes estudadas. O interesse deste estudo residiu no facto de ser conhecido que os polifenóis podem, em determinadas condições, como por exemplo quando presentes em doses elevadas, como é o caso do extrato de grão, atuar como pró-oxidantes e gerar radicais capazes de oxidar proteínas, lípidos e causar danos ao nível do DNA (Ferguson, 2001). Desta forma,

colocou-se a hipótese deste extrato poder apresentar problemas em relação à segurança da sua aplicação. O teste de Ames foi efetuado na estirpe TA102 por ser conhecida a sensibilidade desta estirpe na detecção de mutagénios do tipo oxidativo (Levin *et al.*, 1984; Mortelmans e Zeiger, 2000). A ausência de resultados positivos é um bom resultado mas não descarta a necessidade de realizar mais ensaios, nomeadamente com outras estirpes e na presença de sistemas de ativação metabólica, como a fração S9.

4. Conclusão

A alfarroba, fruto da espécie *Ceratonia siliqua* L., tem sido objeto de estudo, com o objetivo de aprofundar o conhecimento acerca deste fruto, e maximizar as suas utilizações, estudando as propriedades e características dos seus componentes. Apesar de, no início, apenas o seu grão ser utilizado como aditivo devido às suas características espessantes, emulsificantes e espessantes e a sua polpa ser apenas utilizada como alimento para animais, ou para confeitaria regional a uma pequena escala, nos dias de hoje, e cada vez mais, o seu consumo tem aumentado como alternativa a outros alimentos. Assim, é de grande importância compreender melhor as propriedades dos componentes da alfarroba, de modo a que esta seja explorada de uma forma mais eficiente em vários setores industriais.

Assim, no presente estudo avaliou-se o potencial antioxidante e antimicrobiano de extratos preparados a partir de vários componentes deste fruto (polpa, vagem inteira e grão) com vista à sua possível utilização na indústria alimentar, bem como na indústria cosmética. Os extratos mostraram todos atividade antioxidante e atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas. Contudo, o extrato de grão destacou-se de todos os restantes por apresentar atividades mais expressivas, consequência do seu teor mais elevado em compostos fenólicos. No entanto, os restantes extratos, apesar de menos eficazes, exercem igualmente atividade antioxidante.

As bactérias que se mostraram sensíveis ao extrato de grão são microrganismos que podem causar infeções alimentares (*S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*). O facto do extrato ter apresentado uma elevada capacidade antioxidante e ter sido ativo contra estas bactérias, sugere a sua possível aplicação na indústria alimentar, onde pode funcionar como conservante e como antioxidante. Por outro lado, o extrato de grão mostrou-se igualmente capaz de inibir o crescimento de microrganismos que podem causar infeções na pele (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. acnes*), o que aliado ao seu elevado potencial antioxidante sugere, igualmente, que este extrato possa ser aplicado em produtos tópicos, protegendo a pele contra os processos oxidativos e contra microrganismos deste género. A incorporação deste extrato neste tipo de produtos pode ainda ajudar na conservação do próprio produto.

Por sua vez, a incorporação deste extrato em produtos tópicos de utilização hospitalar poderia contribuir para a prevenção e diminuição das infeções oportunistas causadas pela utilização prolongada de antibióticos em meio hospitalar. Neste contexto destaca-se a sua ação contra o *S. aureus*, em especial contra o MRSA, e contra o *E. faecalis*, bactérias associadas a resistências a antibióticos e que constituem um problema sério especialmente em ambiente hospitalar. Por outro lado, a sua ação contra a *P. acnes*, sugere, igualmente, que este extrato possa ter potencial para ser incorporado em produtos tópicos como princípio ativo no combate à acne.

Um ponto bastante interessante seria o de estudar a composição fenólica dos vários extratos, com o objetivo de identificar os compostos que mais contribuem para a sua bioatividade. Esta identificação permitiria efetuar uma melhor padronização dos extratos. Outro ponto interessante seria aprofundar os estudos sobre a segurança dos extratos, uma vez que, apesar da alfarroba ser utilizada na alimentação há já muitos anos, não se pode descartar a possibilidade dos extratos preparados a

partir deste fruto poderem apresentar algum tipo de toxicidade. Com efeito, a preparação de extratos altera a concentração e a biodisponibilidade dos compostos presentes.

Atualmente, e cada vez mais, vários setores industriais, como o setor alimentar ou o da cosmética, têm procurado desenvolver os seus produtos recorrendo a compostos naturais, em detrimento de compostos sintéticos, devido à maior procura por produtos seguros e o mais naturais possíveis por parte do consumidor. Os resultados obtidos sugerem a potencial aplicação da alfarroba na indústria alimentar, mas também na indústria cosmética, ao melhorar as propriedades dos seus produtos, quer em termos da sua segurança microbiológica, bem como ao nível da sua eficácia.

5. Referências Bibliográficas

- Adams, M. R., Moss, M. O. (2008). Food Microbiology, 3ª edição, RSCPublishing, United Kingdom, 185-256 p., ISBN 9780854042845.
- Agudelo-Castañeda, D., Teixeira, E., Schneider, I., Lara, S., Silva, L. (2017). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric PM1.0 of urban environments: Carcinogenic and mutagenic respiratory health risk by age groups. *Environmental Pollution*, 224: 158-170.
- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V, Aguiar, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33(10): 2202-2210.
- Amarowicz, R., Pegg, R., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84(4): 551-562.
- Ames, B., Lee, F., Durston, W. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the national academy of sciences of U.S.A.* 70(3): 782–786.
- Antunes, L., Araújo, M. (2000). Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos Principais Corantes para Alimentos. *Revista Nutrição*, 13 (2), 81-88.
- Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik SE, Bektaşoğlu B, Berker KI e Özyurt D (2007) Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12: 1496–1547.
- Apak, R., Güçlü, K., Ozyurek, M., Çelik, S. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4): 413-419.
- Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M., Karademir, S. E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26): 7970 – 7981.
- Apak, R., Güçlü, K., Ozyurek, M., Karademir, S., Erçag, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(5/6): 292-304.
- Avello, M., Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 494: 161-172.
- Bacle, G., Sikora, S. K., Ek, E. (2017). *Propionibacterium Acnes* Infection of a Metacarpophalangeal Joint Arthroplasty. *The Journal of Hand Surgery*, 42(5): 394.
- Barros L, Carvalho A. M., Morais J. M., Ferreira I. (2010) Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120, pp 247–254.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., Turck, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4): 493-496.
- Benković, M., Belščak-Cvitanović, A., Bauman, I., Komes, D., Srećec S. (2017). Flow properties and chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua* L.) flours as related to particle size and seed presence. *Food research International*, 100: 211-218.

- Bernardo-Gil, M. G., Roque, R., Roseiro, L. B., Duarte, L. C., Gírio, F., Esteves, P. (2011). Supercritical extraction of carob kibbles (*Ceratonia siliqua* L.). *The Journal of Supercritical Fluids*, 56: 36-42.
- Bilal, M., Rasheed, T., Iqbal, H. M., Hu, H., Wang, W., Zhang, X. (2017). Macromolecular agents with antimicrobial potentialities: A drive to combat antimicrobial resistance. *International journal of biological macromolecules*, 103: 554-574.
- Blainski, A., Lopes, G., Mello, J. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from Limonium Brasiliense L. *Molecules*, 18(6): 6852-6865.
- Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2): 382-398.
- Breidenstein, E., Fuente-Núñez, C., Hancock, R. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8): 419-426.
- Buchli, L. (2002). Radicais livres e antioxidantes. *Cosmetics and Toiletries*, 14(2): 54-57.
- Calderone R. A., Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9(7): 327-335.
- Carpentier, B., Cerf, O. (2011). Review – Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1): 1-8.
- Césarini, J., Michel, L., Maurette, J., Adhoute, H., Béjot, M. (2003). Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. *Photodermatology, photoimmunology and photomedicine*, 19(4): 182-189.
- Céspedes, T., Sánchez, D., (2000). Algunos aspectos sobre estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana de Cardiología*, 14: 55-60.
- Clarke, G., Ting, K., Wiart, C., Fry, J. (2013). High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest. *Antioxidants*, 2(1): 1-10.
- Clarke, L.L. (2009). A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine, American. Journal of. Physiology. *Gastrointestinal and liver physiology*, 296(6): 1151–1166.
- Creti, R., Imperi, M., Bertuccini, L., Frabetti, F., Orefici, G., Rosa, R., Baldassarri, L. (2004). Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of Medical Microbiology*, 53(1): 13-20.
- Custódio, L., Escapa, A. L., Fernandes, E., Fajardo, A., Aligué, R., Alberício, F., Neng, N., Nogueira, J. M., Romano, A. (2011). Phytochemical Profile, Antioxidant and Cytotoxic Activities of the Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) Germ Flour Extracts. *Plant foods for Human Nutrition*, 66: 78-84.
- Custódio, L., Patarra, J., Alberício, F., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Romano, A. (2015). *In vitro* antioxidant and inhibitory activity of water decoctions of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) on cholinesterases, α -amylase and α -glucosidase. *Natural product research*, 29(22): 2155-2159.
- Dakia, P. A., Wathelet, B., Paquot, M. (2007). Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. *Food Chemistry*, 102(4): 1368-1374.
- Dakia, P., Blecker, C., Robert, C., Wathelet, B., Paquot, M. (2008). Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, 22(5): 807-818.

- De Flora, S., Izzotti, A., Randerath, K., Randerath, E., Bartsch, H., Nair, J., Balansky, R., Van Schooten, F., Degan, P., Fronza, G., Walsh, D., Lewtas, J.. (1996). DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutation Research*, 366(3): 197–238.
- Dubin, G., Chmiel, D., Mak, P., Rakwalska, M., Rzychon, M., Dubin, A. (2001). Molecular Cloning and Biochemical Characterisation of Proteases from *Staphylococcus epidermidis*. *Biological Chemistry*, 382(11): 1575-1582.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5): 1768-1774.
- Durazzo, A., Turfani, V., Narducci, V., Azzini, E., Maiani, G., Carcea, M. (2014). Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carob flours. *Food Chemistry*, 153:109-113.
- Eloff, J. (1998). A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Medica*, 64(8): 711 - 713.
- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11): 7687-7692.
- FAOSTAT, 2016. FAO Statistics Division. (consultado em: 11/03/2018).
- Farber J. M., Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews*, 55(3): 476-511.
- Ferguson, L.R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475: 89–111.
- Ferguson, L., Philpott, M. (2008). Nutrition and Mutagenesis. *Annual Review Nutrition*, 28: 313-332.
- Ferguson, L.R., Philpott, M., Karunasinghe, N, (2004), Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 198:147-159.
- Ferreira, I., Abreu, R. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, 2: 32-39.
- Flora, S. (1998). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, 402:151-158.
- Fuchs, J. (1998). Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR- α -tocopherol, L-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(7): 848-873.
- Garay, E. L. R. (2017). Avaliação da Bioacessibilidade de Compostos Antioxidantes de Plantas Aromáticas: Orégãos e Tomilho limão. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar – Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Gellatly, S. L., Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3): 159-173.
- Gill, S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-930.
- Grange, P. A., Raingeaud, J., Morelle, W., Marcelin, A., Calvez, V., Dupin, N. (2017). Characterization of a *Propionibacterium acnes* Surface Protein as a Fibrinogen-Binding Protein. *Scientific Reports*.

- Grassl, G. A., Finlay, B. B. (2008). Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24(1): 22-26.
- Guinebretière, M. H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., Sarrau, B., Buyser, M., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P. E., Lereclus, D., Vos, P., Nguyen, C., Sorokin, A. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. Nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(1): 31-40.
- Gülçin, I., (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217: 213-220.
- Hacek, D. M., Dressel, D. C., Peterson, L. R. (1999). Highly Reproducible Bactericidal Activity Test Results by Using a Modified National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Technique. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6): 1881.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Science Publication, 3ª Edição, ISBN: 9780198500452.
- Harvey, R.A., Champe, P.C., Fisher, B.D., Strohl, W.A. (2007). Lippincott's illustrated reviews: microbiology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, EUA, 438 p., ISBN:0781782155 9780781782159.
- Hazra, B., Biswas, S., Mandal, N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BCM Complementary and Alternative Medicine*, 8: 63.
- Hidayat, L. K., Hsu, D. I., Quist, R., Shriner, K. A., Wong-Beringer, A. (2006). High-dose vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: efficacy and toxicity. *Archives of Internal Medicine*, 166(19): 2138-2144.
- Hussain, S., Schwank, J., Staib, F., Wang, X., Harris, C. (2007). TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*, 26: 2166–2176.
- Hyder, M., Priscilla, H., Thirumurugan, K. (2010). Antimicrobial activity and phytochemical analysis of selected Indian folk medicinal plants. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1(10): 430-434.
- Jackson, B. R., Griffin, P. M., Cole, D., Walsh, K. A., Chai, S. (2013). Outbreak – associated *Salmonella enterica* Serotypes and Food Commodities, United States, 1998-2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19(8): 1239 – 1243.
- Jay, L. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2005). Modern Food Microbiology, 7ª Edição, Springer, USA, 637-648 p., ISBN: 0387231803.
- Jimenez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., Quax, W. J. (2012). The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1): 46-65.
- Karababa, E., Coskuner, Y. (2013). Physical properties of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.): An industrial gum yielding crop. *Industrial Crops and Products*, 42: 440-446.
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6): 453-464.
- Karki, A., Tiwari, B. (2007). Prevalence of acute diarrhoea in Kathmandu valley. *Journal of the Nepal Medical Association*, 46(168): 175-179.

- Kim, J. B., Kim, J. M., Oh, H., Choi, N. J., Oh, D. (2011). Toxin Genes Profiles and Toxin Production Ability of *Bacillus cereus* Isolated from Clinical and Food Samples. *Journal of Food Science*, 76(1): 25-29.
- Kivçak, B., Mert, T., Ozturk, H. T. (2002). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Ceratonia siliqua* L. extracts. *Turkish Journal of Biology*, 26(1): 197-200.
- Klancnik, A., Piskernik, S., Jersek, B., Mozina, S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81: 121-126.
- Kosar, M., Fatih, G., Baser, K.H.C. (2008). *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 2369–2374.
- Leandro, R N. (2015). Avaliação do potencial anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano de extratos de segurelha, salsa e coentros. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar - Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Ames, B.N. (1984). Detection of oxidative mutagens with a new Salmonella tester strain (TA102). *Methods in Enzymology*, 105: 249-254.
- Levy, P. Y., Fenollar, F., Stein, A., Borriane, F., Cohen, E., Lebaill, B., Raoult, D. (2008). *Propionibacterium acnes* Postoperative Shoulder Arthritis: An Emerging Clinical Entity. *Clinical Infectious Diseases*, 46(12): 1884-1886.
- Liu, C., Bayer, A, Cosgrove, S. E., Daum, R. S., Fridkin, S. K., Gorwitz, R. J., Kaplan, S. L., Karchmer, A. W., Levine, D. P., Murray, B. E., Rybak M. J., Talan, D.A., Chambers, H. F. (2011). Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clinical Infectious Diseases*, 52(3): 18-55.
- Liu, R. (2013) Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*. 78(1):18 - 25.
- Liu, X. (2016). Phytochemical background matters for bioactivity of plant metabolites : a case study with pyrrolizidine alkaloids. Universiteit Leiden, Netherlands.
- Magalhães, J. (2000). O uso de cosméticos através dos tempos, envelhecimento cutâneo. *Cosmetologia*, 33-42.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S. Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1): 1-19.
- Maizura, M., Aminah, A., Wan, W. (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. *International Food Research Journal*, 18: 526-531.
- Makwana, S., Choudhary, R., Haddock, J., Kohli, P. (2015). *In vitro* antibacterial activity of plant based phenolic compounds for food safety and preservation. *LWT - Food Science and Technology*, **62(2)**, 935-939.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1): 230-242.
- Maron, D., Ames, B. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity testing. *Mutation Research*, 113: 173–215.

- Mathabe, M. C., Nikolova, R.V., Lall, N., Nyazema, N. Z. (2006). Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(1): 286-293.
- Maurício, E., Rosado, C., Duarte, M. P., Verissimo, J., Bom, S., Vasconcelos, L. (2017). Efficiency of Nisin as Preservative in Cosmetics and Topical Products. *Cosmetics*: 4(4), 41.
- Mbata, T., Saikia, A., (2006). Antibacterial activity of the crude extract of Chinese Green Tea. *International Journal of Microbiology*, 7(19): 1571.
- Mestankova, H., Schirmer, K., Canonica, S., Gunten, U. (2014). Development of mutagenicity during degradation of N-nitrosamines by advanced oxidation processes. *Water Research*, 66: 399-410.
- Miceli, N., Trovato, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Marino, A., Bellinghieri, V., La Barbera, T.M., Güvenç, A., Taviano, M.F., (2009). Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 6570–6577.
- Moon, J. L., Banbula, A., Olesky, A., Mayo, J. A., Travis, J. (2001). Isolation and Characterization of a Highly Specific Serine Endopeptidase from an Oral Strain of *Staphylococcus epidermidis*. *Biological Chemistry*, 382(7): 1095-1099.
- Moon, J., Shibamoto, T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5): 1655-1666.
- Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455: 29–60.
- Nakamura, S., Kato, A., Kobayaahit, K., (1992). Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 2033-2037.
- Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J., Gow, A. R. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 67-78.
- Nikolic, M. (2006). Theoretical study of phenolic antioxidants properties in reaction with oxygen-centered radicals. *Journal of Molecular Structure*, 774(1): 95-105.
- Okigami, H. (2001). Radicais livres e pele. *Congresso Brasileiro de cosmetologia: Ciência e Tecnologia, a cosmética do futuro*, 15:6.
- Olguin, G., Meléndez, G., Zuñiga, A., Pasquetti, A., (2004). Antioxidantes y aterosclerosis. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 4: 199-206.
- Orsi, R. D. O., Sforcin, J. M., Cunha Funari, S. R., Fernandes, A., Bankova, V. (2006). Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella typhi*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(2): 108–112.
- Ostrosky, E., Mizumoto, M., Lima, M., Kaneko, T., Nishikawa, S., Freitas, B. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2): 301-307.
- Ozyurek, M., Bektasoglu, B. Guçlu, K., Apak, R. (2008). Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidante capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. *Analytica Chimica Acta*, 616(2): 196-206.
- Pan, X., Redding, J., Wiley, P., Wen, L., McConnell, J., Zhang, B. (2010). Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay. *Chemosphere*, 79(1): 113-116.

- Patra, A. K., Saxena, J. (2011). Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(1): 24-37.
- Pekal, A., Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7(9): 1776-1782.
- Perry, A., Lambert, P. (2011). *Propionibacterium acnes*: infection beyond the skin. *Expert Review on Anti-infective Therapy*, 9(12): 1149-116.
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the Max. *Frontiers in Microbiology*, 65(2).
- Prior, R. L., Wu, X., Schainch, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 4290-4302.
- Qi, L., Bai, T., Chen, Z., Wu, F., Chen, Y., Xiang, B., Peng, T., Han, Z., Li, L. (2014). The p53 mutation spectrum in hepatocellular carcinoma from Guangxi, China : role of chronic hepatitis B virus infection and aflatoxin B1 exposure. *Liver International*, 35(3): 999-1009.
- Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., Aruoma, O. I. (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts os Mauritian citrus fruits: Potencial prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 278(1): 75-87.
- Rasteiro, E. M. N. (2012). Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares de *Vaccinium spp*, do grupo “Southern Highbu.sh”, produzidas em Portugal. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar - Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Ratnam D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M. N. (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113:189–207.
- Ray, B. (2004). *Fundamental Food Microbiology*, 3ª Edição, CRC Press LLC, Florida, 13 p., ISBN 203998251.
- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Sctis-Goretta, L., Thakkar, S. K., Silva, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3): 588-602.
- Roseiro L. B., Tavares, C. S., Roseiro, J. C., Rauter, A. P. (2013). Antioxidants from aqueous decoction of carob pods biomass (*Ceratonia siliqua* L.): Optimisation using response surface methodology and phenolic profile by capillary electrophoresis. *Industrial Crops and Products*, 44: 119-126.
- Roseiro, L. B., Duarte, L. C., Oliveira, D. L., Roque, R., Bernardo-Gil, M. G., Martins, A. I., Sepúlveda, C., Almeida, J., Meireles, M., Gírio, F. M., Rauter, A. P. (2013). Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonia siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Industrial Crops and Products*, 47: 132-138.
- Rtibi, K., Jabri, M. A., Selmi, S., Souli, A., Sebai, H., El-Benna, J., Amri, M., Marzouki, L. (2015) Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) inhibit human neutrophils myeloperoxidase and in vitro ROS-scavenging activity. *RSC Advances*, 102: 584207–84215.
- Rtibi, K., Jabri, M.A., Selmi, S., Sebai, H., Marie, J.C., Amri, M., Marzouki, L., El- Benna, J. (2016b). Preventive effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in rat. *RSC Advances*, 6(24): 19992–20000.

- Rtibi, K., Jabri, M.A., Selmi, S., Souli, A., Sebai, H., Amri, M., El- Benna, J., Marzouki, L. (2015). Gastroprotective effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) against ethanol-induced oxidative stress in rat, *BMC Complementary Alternative. Medicine*, 15:292.
- Rtibi, K., Selmi S., Grami, D., Amri, M., Eto, B., El-benna, J., Sebai, H., Marzouki, L. (2017). Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93: 522-528.
- Rtibi, K., Selmi, S., Jabri, M. A., Mamadou, G., Limas-Nzouzi, N., Sebai, H., El- Benna, J., Marzouki, L., Eto, B., Amri, M. (2016a). Effects of aqueous extracts from *Ceratonia siliqua* L. pods on small intestinal motility in rats and jejunal permeability in mice, *RSC Advances*. 6: 44345–44353.
- Scotti, L., Scotti, M., Cardoso, C., Pauletti, P., Castro-Gamboa, I., Bolzani, V., Velasco, M., Menezes, C., Ferreira, E. (2007). Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(2): 153-166.
- Seed, N., Khan, M., Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12: 221.
- Sepahpour, S., Selamat, J., Khatib, A., Manao, M., Razis, A. (2018). Inhibitory effect of mixture herbs/spices on formation of heterocyclic amines and mutagenic activity of grilled beef. *Food additives and contaminants: Part A*, 23:1-17.
- Serrano, J., Puupponen-Pimia, R., Dauer, A., Aura, A., Saura-Calixta, F. (2009). Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(2): 310-329.
- Shan, B., Cai, Y., Brooks, J., Corke, H. (2007). The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1): 112-119.
- Shankar, N., Baghdayan, A. S., Gilmore, M. S. (2002). Modulation of virulence within a pathogenicity Island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*, 417: 746-450.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999) Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods of Enzymology*, 299:152-178.
- Sofi, F., Dinu, M.R. (2016) Nutrition and prevention of chronic-degenerative diseases. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 8:713 – 717.
- Sudbery, P., Gow, N., Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 12(7): 317-324.
- Sung, W., Chang, Y., Chou, Y., Hsiao, H. (2018). The functional properties of chitosan-glucose-asparagine Maillard reaction products and mitigation of acrylamide formation by chitosans. *Food Chemistry*, 243:141-144.
- Szterk, A. (2015). Heterocyclic aromatic amines in grilled beef: The influence of free amino acids, nitrogenous bases, nucleosides, protein and glucose on HAAs content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40: 39–46.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S., Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218.

- Tepe, B., Daferera, D., Sökmen, M., Polissiou, M., (2004). *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5): 1132-1137.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiological Reviews*, 28(3): 603-661.
- Tsatsaragkou, K., Gounaropoulos, G., Mandala, I. (2014). Development of gluten free bread containing carob flour and resistant starch. *Food Science and Technology*, 58(1): 124-129.
- USDA, 2018. U.S Department of agriculture. (consultado em 19/05/2018).
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Bastos, M. L. (2001). Antioxidant activity of *Centaurium erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7): 3476-3479.
- Viuda-Martos, M., Navajas, Y., Zapata, E., Fernández-Lopez, J., Pérez-Álvarez, J. (2009). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(1): 13-19.
- Weichselbaum, E., Buttriss, J. L. (2010). Polyphenols in the diet. *Nutrition Bulletin*, 35(2): 157-164.
- Williamson G., Manach C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 243–245.
- Youssef, M., El-Manfaloty, M., Ali, H. (2013). Assessment of Proximate Chemical Composition, Nutritional Status, Fatty Acid Composition and Phenolic Compounds of Carob (*Ceratonia Siliqua* L.). *Food and Public Health*, 3(6): 304-308.
- Zgoda, J., Porter, J. (2001). A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi. *Pharmaceutical Biology*, 39(3): 221-225.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64: 555-559.